

Postverlagsort Berlin

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

ARCHIV FÜR JUN 24 '64

MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPET

HERAUSGEGEBEN VON
C. B. VAN NIEL **R. NILSSON** **E. G. PRINGSHEIM**
PACIFIC GROVE UPPSALA GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE
W. H. SCHOPFER **H. TAMIYA**
BERN TOKIO

UND DEN SCHRIFTLEITERN

A. RIPPET-BALDES **R. HARDER**
GÖTTINGEN GÖTTINGEN

25. BAND · 4. (SCHLUSS-) HEFT

MIT 35 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 19. JANUAR 1957)



Per.
QR 1
Ar 25

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1957

Arch.
Mikrobiol.

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930
von J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden. Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. C. B. van Niel/California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbruks högskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karlsruhe, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Balde, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Nikolausberger Weg 18

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

25. Band

Inhaltsverzeichnis

4. (Schluß-) Heft

Seite

CORBAZ, R., L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN und H. ZÄHNER, Zur Systematik der Actinomyceten. I. Über Streptomyces mit rhodomycinartigen Pigmenten. Mit 3 Textabbildungen	325
DREWS, G., und W. NIKLOWITZ, Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. III. Mitteilung. Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hormogonales. Mit 15 Textabbildungen	333
HELWIG, R., Untersuchungen an cellulosezersetzenden Pansenbakterien. Mit 9 Textabbildungen	352
BRUNNER, G., Eine neuere Beobachtung über Antibiose bei Pseudomonas-Bakterien	369
WITTMANN, H., Untersuchungen über die Veränderung der Carotinoidkomponenten von Rhodotorula rubra in Abhängigkeit von Ernährungsbedingungen. Mit 3 Textabbildungen	373
PROVASOLI, L., J. J. A. McLAUGHLIN und M. R. DROOP, The Development of Artificial Media for Marine Algae	392
CLAYTON, R. K., E. O. ELLINGSON und H. E. SHAW, A Carbon Dioxyde Requirement for the Metabolism of Propionate in Rhodospirillum rubrum. With 5 figures in the text	429
Berichtigungen zu den Arbeiten von N. PFENNIG und W. SCHMIDT-LORENZ	432
Autorenverzeichnis	433

(Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich)

Zur Systematik der Actinomyceten*

1. Über Streptomyces mit rhodomycinartigen Pigmenten

Von

R. CORBAZ, L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN und H. ZÄHNER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. April 1956)

Unter dem Namen Rhodomycin beschreiben BROCKMANN, BAUER u. BÖRCHERS (1951) ein Gemisch roter, lipophiler, basischer Antibiotica, das sie aus Kulturen von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein (LINDENBEIN 1952) isoliert haben. Aus dem Basengemisch konnten BROCKMANN u. PATT (1955) das Rhodomycin A, das Rhodomycin B und das Isorhodomycin A in reiner Form gewinnen. Bei der Hydrolyse mit verdünnter Mineralsäure werden die Rhodomycine und Isorhodomycine in gefärbte, nichtbasische Aglykone, die Rhodomycinone und Iso-rhodomycinone (vgl. unter anderem BROCKMANN u. FRANCK 1955) und einen Aminozucker, das Rhodosamin (BROCKMANN u. SPOHLER 1955) gespalten. Die Rhodomycinone und Isorhodomycinone werden vor allem durch ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Papierchromatogramm charakterisiert und nach abnehmender Polarität mit den griechischen Buchstaben α bis ϵ bezeichnet. Sie besitzen dasselbe Chromophor wie die un behandelten Basen. Eingehender charakterisiert wurden bisher das β -Rhodomycinon, das ϵ -Rhodomycinon und das ϵ -Isorhodomycinon (vgl. BROCKMANN u. FRANCK 1955). Nach FROMMER (1955, 1956) sollen in Kulturen von *S. purpurascens* auch freie Rhodomycinone zu finden sein.

Bei der Prüfung einiger tausend Actinomycetenstämme sind wir bisher auf 14 eigene Isolierungen gestoßen, deren antibiotische Aktivität entweder auf Rhodomycine oder rhodomycinähnliche Pigmente zurückzuführen war. Über die Klassifizierung dieser Kulturen, für die als Vergleichsmaterial authentische Kulturen von *Streptomyces purpurascens* Lindenbein sowie *Streptomyces bobiae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici beigezogen wurden, sei im folgenden berichtet.

* Im Rahmen eines größeren Forschungsprojekts, an dem das Organisch-chemische Laboratorium der E. T. H., Zürich, die Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, und das Institut für spezielle Botanik der E. T. H., Zürich, beteiligt sind, werden wir vor die Aufgabe gestellt, chemisch interessante Actinomycetenstämme zu klassifizieren. Über die Ergebnisse, soweit sie von allgemeinem Interesse sind, soll in dieser Publikationsreihe berichtet werden.

I. Herkunft der untersuchten Stämme

a) Vergleichsmaterial

NRRL B-1480 Streptomyces purpurascens Lindenbein, authentischer Stamm von Prof. Dr. W. LINDENBEIN, erhalten durch das Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (CBS).

ATCC 3310 Streptomyces bobiliae (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici, Syn.: *Actinomyces Bobili* Waksman et Curtis. Authentischer Stamm der N. J. Agr. Exp. Station, erhalten durch die American Type Culture Collection, Washington (ATCC).

CBS S. bobiliae, authentischer Stamm (vermutlich derselbe) von Prof. Dr. S. A. WAKSMAN, erhalten durch das CBS.

b) Eigene Isolierungen

ETH 6143 aus Erdprobe vom Zürcher Zoo, 16. 5. 1950.

ETH 7451 aus Erdprobe von Les Antiques, Alpilles, Provence, 22. 4. 1952.

ETH 7486 aus Erdprobe von Quibaxe, Angola, 16. 10. 1950.

ETH 7527 aus Erdprobe von Delhi Fort, 1952.

ETH 7861 aus Erdprobe von Molinet b. Dijon, 5. 7. 1952.

ETH 8279 aus Erdprobe von Gandria, Tessin, 7. 3. 1953.

ETH 9386 aus Erdprobe von Bigogno, Malcantone, Tessin, 14. 4. 1954.

ETH 9927 aus Erdprobe vom Passo dell' Uomo, Tessin, 28. 8. 1954.

ETH 9933 aus einem Blumentopf (*Primula malacoides* der Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil), 4. 1. 1955.

ETH 9947 aus Erdprobe vom Lukmanier, Graubünden, 28. 8. 1954.

ETH 9953 aus Kakaobohnen, Venezuela.

ETH 9979 aus Erdprobe von Donaueschingen, 10. 10. 1954.

ETH 10830 aus Erdprobe von der Akropolis, Athen, 21. 4. 1955.

ETH 11127 aus Erdprobe von Sirmione, Gardasee, 2. 4. 1955.

II. Charakterisierung der Pigmente

Die Pigmente der 14 Isolierungen wie auch der Vergleichskulturen stellten durchwegs nicht einheitliche Verbindungen, sondern Gemische mehrerer chemisch verwandter Komponenten dar. Sie können insofern als rhodomycinartig bezeichnet werden, als sie alle das für Rhodomycin typische Absorptionsspektrum im sichtbaren Wellenbereich aufweisen. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren genügten im allgemeinen die Konzentrationen von Rohextrakten oder Rohbasen.

Methodik. Der betreffende Organismus wurde in Schüttelkolben oder Gärtnern bei 27° C auf einer der beiden folgenden Nährösungen gezüchtet: a) 3 g OXO Lab Lemco Fleischextrakt, 5 g Pepton, 10 g Rohglucose, 5 g Natriumchlorid, 10 g Calciumcarbonat, 1 l Leitungswasser; pH 7,5 vor dem Sterilisieren. b) 20 g Sojamehl, 20 g Mannit, 1 l Leitungswasser; pH 7,8 vor dem Sterilisieren. Nach 3—5 Tagen wurde die ganze Kultur bei pH 8,5—9 mehrmals mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Aus den Rohextrakten wurden durch Ausschütteln mit verdünnter Säure, Alkalisieren der abgetrennten wässrigen Phase und erneutem Ausschütteln mit Äthylacetat die Rohbasen abgetrennt. Erwähnt sei, daß die intensiv orangeroten organischen Lösungen beim Alkalisieren einen Farbumschlag nach blauviolett zeigen. Eine weitere Auf trennung der Rohbasen bis zu chemisch einheitlichen Komponenten läßt sich durch CRAIG-Verteilung erreichen.

In den meisten Fällen begnügten wir uns mit einer papierchromatographischen Charakterisierung der Basengemische bzw., da diese sich auf Filterpapier nur unscharf trennen lassen, ihrer Aglykone.

Methodik. Die pigmenthaltigen Extrakte (15—50 mg) wurden in wenig Äthylacetat gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure ausgeschüttelt, und die abgetrennte wäßrige Phase 10—15 min im siedenden Wasserbad erwärmt. Die nichtbasischen Aglykone wurden in Äthylacetat aufgenommen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die Papierchromatographie der Aglykone wurde nach der absteigenden Methode auf Filterpapier Whatman Nr. 1 im System Benzol-Formamid (vgl. BROCKMANN u. FRANCK 1955) ausgeführt. Die Aglykone lassen sich im Chromatogramm durch ihre Eigenfarbe erkennen.

Nach den im Hydrolysat vorgefundenen Aglykonen kann man die untersuchten Streptomyces in 2 Gruppen einteilen:

1. **Rhodomycinbildner.** Sie produzieren Rhodomycine, die Glycoside der von BROCKMANN u. Mitarb. beschriebenen Rhodomycinone α bis ε sind. Es lassen sich hier zwei Untergruppen aufstellen, aber nicht scharf voneinander trennen: 1a. Als Hauptkomponente tritt das β -Rhodomycinon (R_f 0,27) auf; in geringen Mengen sind daneben α - (R_f 0,10), γ - (R_f 0,64), δ - (R_f 0,77) und ε -Rhodomycinon (R_f 0,85) nachweisbar. Hierher gehören der authentische *S. purpurascens* und unser Stamm ETH 9386. 1b. β - und γ -Rhodomycinon sind in vergleichbaren Mengen vorhanden; oft herrscht sogar γ -Rhodomycinon vor. α -Rhodomycinon wird gelegentlich in kleinen Mengen gefunden. δ - und ε -Rhodomycinon fehlen in der Regel. Hierher gehören die meisten unserer Isolierungen, nämlich ETH 7451, ETH 7527, ETH 7861, ETH 9927, ETH 9933, ETH 9947, ETH 9953, ETH 9979, ETH 10830 und ETH 11127. Die Stämme ETH 7486 und ETH 8279 nehmen eine Mittelstellung zwischen den beiden Untergruppen ein.

2. **Cinerubinbildner.** Diese Gruppe benennen wir nach Cinerubin, der Hauptkomponente des Antibioticagemischs von ETH 6143, die wir rein dargestellt haben und an anderem Orte beschreiben werden (in Vorbereitung). Die Aglykone dieser Gruppe besitzen einen entschieden weniger polaren Charakter als die der Rhodomycingruppe. Das vorherrschende Aglykon, das wir Cinerubinon nennen, besitzt einen R_f -Wert von 0,85, wandert also etwa gleich rasch wie ε -Rhodomycinon; daß diese beiden Verbindungen dennoch nicht identisch sind, konnte durch IR-Spektrum, Schmelzpunkt und analytische Daten gezeigt werden (l. c.). Daneben lassen sich in geringer Menge Aglykone mit R_f 0,65, 0,76 und 0,94 nachweisen. In diese Gruppe gehört außer dem erwähnten ETH 6143 auch der authentische *Streptomyces bobiae* (ATCC 3310 und CBS). Das Hauptantibioticum von *S. bobiae* unterscheidet sich von dem beschriebenen Cinerubin vermutlich nur durch eine seiner Zuckerkomponenten.

III. Beschreibung der Organismen

1. *Streptomyces purpurascens* Lindenbein. Material: NRRL B-1480, ETH 9386.

Der Beschreibung von LINDENBEIN (1952) sei lediglich beigegeben: Sporen oval, $0,8-1 \times 0,4-0,5 \mu$, bedeckt mit langen (etwa $0,4 \mu$), auch an der Basis dünnen Stacheln (Abb. 1).

Unsere Isolierung ETH 9386 paßt in allen Merkmalen zu *S. purpurascens* (Abb. 2).



Abb. 1. Sporen von *S. purpurascens*,
Stamm Lindenbein

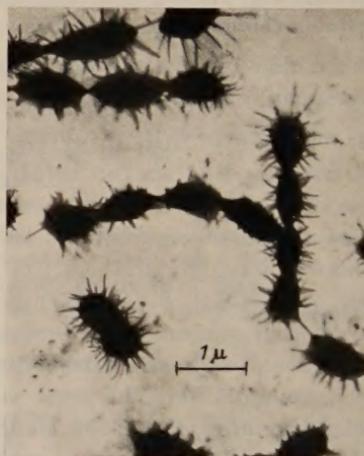


Abb. 2. Sporen von *S. purpurascens*,
Stamm ETH 9386

Die Benützung verschiedener Kohlenstoffquellen zeigt Tab. 1. Unsere Befunde decken sich mit denen von BENEDICT, PRIDHAM et al. (1955) an 3 Stämmen von *S. purpurascens*, mit Ausnahme von Sorbit (dort +), was wir nicht als wesentlichen Unterschied ansehen.

2. *Streptomyces bobiliae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici. Material: ATCC 3310, CBS.

Beide Kulturen zeigen praktisch kein Luftmycel und folglich auch keine Sporen. Aus der Originaldiagnose (WAKSMAN u. CURTIS 1916) und der dort beigefügten Photographie ist ersichtlich, daß dieser Organismus schon vor 50 Jahren kaum Luftmycel bildete. Sporen werden überhaupt nirgends erwähnt.

Im C-Quellenspektrum stimmen *S. bobiliae* und *S. purpurascens* gut überein (Tab. 1).

Daß die bisher bekannten Stämme *S. purpurascens* Rhodomycine erzeugen, *S. bobiliae* dagegen Cinerubine, kann kaum als unterscheidendes Merkmal für die Systematik herangezogen werden. Wir vermuten, daß

Tabelle 1. Benützung verschiedener Kohlenstoffquellen. Methodik nach PRIDHAM u. GOTTLIEB (1948)

+ = gutes Wachstum, sichere Verwendung der betreffenden C-Quelle.

(+) = schwaches Wachstum, Verwendung der betreffenden C-Quelle fraglich.

(-) = sehr schwaches Wachstum, Verwendung unwahrscheinlich.

— = kein Wachstum, keine Verwendung.

S. purpurascens ein Synonym zu *S. bobiliae* darstellt. Da diese Vermutung aber ohne Luftmycel und Sporen nicht zu beweisen ist, halten wir uns an die besser vertretene Species.

3. *Streptomyces cinereoruber* nov. sp. Material: ETH 7451, ETH 7486, ETH 7527, ETH 7861, ETH 8279, ETH 9927, ETH 9933, ETH 9947, ETH 9953, ETH 9979, ETH 10830, ETH 11127.

Alle Stämme waren praktisch gleich. Für die Beschreibung stellen wir auf ETH 7451 ab. Luftmycel anfangs weiß, später weißgrau, schließlich

aschgrau; Sporen glatt, leicht in die Länge gezogen, $0,9-2 \times 0,7-1 \mu$ (Abb. 3); Substratmycel rot mit löslichem Pigment.

Synthetischer Agar¹. Wachstum dünn, schleierartig, blaßkarmin, nach 7 Tagen dunkelrot; Luftmycel sammetig, aschgrau; Pigment blaßkarmin.

Synthetische Lösung. Sediment, Flocken weißgelb, nach 21 Tagen blaßkarmin; Pellikel mit spärlichem Luftmycel; lösliches Pigment blaßkarmin.

Glucose-Agar. Wachstum runzlig, ziegelrot bis rötlichbraun; Luftmycel sammetig, aschgrau; lösliches Pigment hellbraun.

Glucose-Asparagin-Agar. Substratmycel dünn, grünlichgrau bis bläulichgrau; Luftmycel sammetig, aschgrau; kein Pigment.

Calciummalat-Agar. Wie Glucose-Asparagin-Agar.

Abb. 3. Sporen von *S. cinereoruber*, Stamm ETH 7451

Gelatinestrich 18° C. Oberflächliches Wachstum pustelig, blaßkarmin und hellbraun; Luftmycel sammetig, weißgrau; starkes lösliches Pigment, rötlichbraun; Verflüssigung nach 14 Tagen beginnend, nach 38 Tagen 1,2 cm.

Stärkeplatte. Substratmycel dünn, korallenrot; Luftmycel sammetig, aschgrau; lösliches Pigment blaßkarmin; Hydrolyse 0,4 cm nach 4 Tagen.

Kartoffeln. Wachstum sehr gut, flechtenartig, bräunlichgelb; Luftmycel sammetig, aschgrau; Substrat bläulichgrau gefärbt.

Karotten. Wie Kartoffeln.

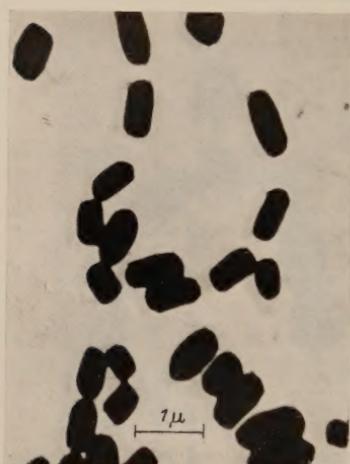
Lackmusmilch. Pellikel hellbraun mit spärlichem Luftmycel, mehlig bestaubt, weißgrau; Gerinnung und Peptonisierung; Lackmus rot.

Der Name ist zusammengesetzt aus *cinereus* (ashgray), der Farbe des Luftmycels und *ruber* (dunkelrot), der Farbe des Pigments.

Bei der offensichtlichen Häufigkeit und Verbreitung dieser Art ist es erstaunlich, daß sie sich nicht mit einer bereits bekannten identifizieren läßt.

Alle isolierten Stämme produzieren Rhodomycine.

¹ Rezepte und Terminologie nach LINDENBEIN (1952).



Die Benützung verschiedener Kohlenstoffquellen wurde bei 5 Stämmen untersucht. Alle 5 verhielten sich praktisch gleich. Von *S. purpurascens*-*S. bobiliae* unterscheiden sie sich wesentlich durch ihr Unvermögen, Rhamnose, Fructose, Saccharose, Raffinose, Inulin und Mesoinosit zu benützen. Fructose ist insofern besonders bemerkenswert, als fast alle bisher von uns und anderen untersuchten Streptomycesen diesen Zucker verwenden können.

4. *Streptomyces cinereoruber* var. *fructofermentans* nov.
var. Material: ETH 6143.

Dieser Stamm stimmt im Verhalten auf diagnostischen Nährböden und in der Morphologie der Sporen völlig mit *S. cinereoruber* überein. Unterschiede bestehen aber im C-Quellenspektrum (Tab. 1), indem er Rhamnose, Fructose und Sorbit zu benützen vermag. Auf diese Unterschiede soll der Name hinweisen. Des weiteren produziert ETH 6143 nicht Rhodomycin, sondern Cinerubin (s. o.).

Diskussion

Die Systematik der Gattung *Streptomyces* fußt gegenwärtig in erster Linie auf löslichen Pigmente (vgl. WAKSMAN u. HENRICI 1948, WAKSMAN u. LECHEVALIER 1953). Nun kann aber, wie schon vom Beispiel der Actinomycine her bekannt ist (vgl. WELSCH 1947, S. 243 ff., LINDENBEIN 1952, WAKSMAN u. GREGORY 1954), und wie wir hier an einem weiteren Beispiel gezeigt haben, das gleiche oder zumindest für das Auge gleiche Pigment von ganz verschiedenen Arten produziert werden. Andererseits läßt sich die Beobachtung von LINDENBEIN (1952) und FROMMER (1955), daß es leicht ist, aus pigmentierten Kulturen von *S. purpurascens* pigmentlose Subkulturen zu erhalten, auch bei allen Stämmen *S. cinereoruber* und *S. cinereoruber* var. *fructofermentans* anstellen.

Wenn auch das lösliche Pigment zweifellos ein wertvolles Hilfsmittel zur Bestimmung von Streptomyces darstellt, so glauben wir doch, daß seine Bedeutung für die Systematik hinter andere, konstantere Merkmale zurückzutreten hat. Als solche sehen wir die Farbe des Luftmycels und die von FLAIG, BEUTELSPACHER et al. (1952) erstmals beschriebene Morphologie der Sporen an.

Zusammenfassung

Von 14 aus Material verschiedener Herkunft isolierten Streptomycesen mit rhodomycinartigen Pigmenten produzierten 13 Stämme Rhodomycin und 1 Stamm Cinerubin. Einer der 13 Rhodomycinbildner ließ sich mit *Streptomyces purpurascens* Lindenbein identifizieren, die restlichen 12 werden als neue Species *Streptomyces cinereoruber* beschrieben. Der Cinerubinbildner, der außer im Antibioticum auch im C-Quellen-

spektrum von *S. cinereoruber* abweicht, wird als *Streptomyces cinereoruber* var. *fructofermentans* nov. var. beschrieben. Cinerubine produzieren ferner authentische Kulturen von *Streptomyces bobiliae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici, die im übrigen größte Ähnlichkeit mit *S. purpurascens* aufweisen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Institut für allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der E. T. H., Zürich, hergestellt. Wir danken Herrn Privatdozent Dr. K. MÜHLETHALER für die Einführung eines von uns (R. C.) in diese Technik und stets bereitwillig gewährte Unterstützung. Fräulein BRIGITTE FELZMANN danken wir für wertvolle Hilfe beim Bestimmen der Actinomyceten.

Literatur

BENEDICT, R. G., T. G. PRIDHAM, L. A. LINDENFELSER, H. H. HALL and R. W. JACKSON: Applied Microbiology **3**, 1 (1955). — BROCKMANN, H., K. BAUER u. I. BORCHERS: Chem. Ber. **84**, 700 (1951). — BROCKMANN, H., u. I. BORCHERS: Chem. Ber. **86**, 261 (1953). — BROCKMANN, H., u. B. FRANK: Chem. Ber. **88**, 1792 (1955). — BROCKMANN, H., u. P. PATT: Chem. Ber. **88**, 1455 (1955). — BROCKMANN, H., u. E. SPOHLER: Naturwissenschaften **42**, 154 (1955). — FLAIG, W., H. BEUTELSPACHER, E. KÜSTER u. G. SEGLER-HOLZWEISSIG: Plant and Soil **4**, 118 (1952). — FROMMER, W.: Arch. Mikrobiol. **23**, 105 (1955). — FROMMER, W.: Arch. Mikrobiol. **23**, 385 (1956). — LINDENBEIN, W.: Arch. Mikrobiol. **16**, 361 (1952). — PRIDHAM, T. G., and D. GOTTLIEB: J. Bacter. **56**, 107 (1948). — WAKSMAN, S. A., and R. E. CURTIS: Soil Sci. **1**, 99 (1916). — WAKSMAN, S. A., and F. J. GREGORY: Antibiotics a. Chemother. **4**, 1050 (1954). — WAKSMAN, S. A., and A. T. HENRICI: BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore 1948. — WASKMAN, S. A., and H. A. LECHEVALIER: Actinomycetes and their Antibiotics. Baltimore 1953. — WELSCH, M.: Phénomènes d'antibiose chez les Actinomycètes. Liège 1947.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin)

Beiträge zur Cytologie der Blaualgen

III. Mitteilung

Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hormogonales

Von

G. DREWS und W. NIKLOWITZ

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Juli 1956)

Die Blaualgenzellen unterscheiden sich cytologisch wesentlich von den Zellen der höheren Pflanzen (GEITLER, 1955). Es war daher nicht möglich, die in ihnen enthaltenen granulären Elemente nach ihrem morphologischen Aspekt mit den plasmatischen Einschlüssen der höheren Pflanzen, wie z. B. Chondriosomen und Sphärosomen zu identifizieren. Die bei den Blaualgen beschriebenen Strukturen wurden mit neuen Namen belegt (Cyanophycinkörper, Metachromatinkörper usw.). Bisher fehlt aber noch eine genaue Kenntnis über ihre stoffliche und funktionelle Natur (DRAWERT, 1949; GEITLER, 1955; v. ZASTROW, 1953).

Untersuchungen an *Phormidium uncinatum* (DREWS u. NIKLOWITZ, 1956) haben ergeben, daß bei dieser Art im Bereich der Querwand regelmäßig Granula anzutreffen sind, die eine submikroskopische Strukturierung erkennen lassen und wahrscheinlich Träger von Redoxasen sind. Die Vermutung, daß auch bei den Blaualgen granuläre Einschlüsse ausgebildet werden, die aktiv am Stoffwechsel der Zelle beteiligt sind, sollte nun durch die Untersuchung mehrerer Arten gesichert werden. Zur Frage des Centroplasmas werden einige lichtmikroskopisch gewonnene Beobachtungen mitgeteilt. Sie werden zusammen mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Strukturanalyse an anderer Stelle diskutiert werden.

Ergebnisse

Lebendbeobachtung

Die Lebendbeobachtung fädiger Blaualgen im normalen Lichtmikroskop wurde bislang fast ausschließlich im Hellfeld durchgeführt. Bei Verwendung des Phasenkontrastes entsteht ein breiter Beugungssaum, der den Einblick in die peripheren Bezirke der Zelle verwehrt (s. Abbildungen bei CASSEL u. HUTCHINSON, 1953). Unter besonderen Voraussetzungen kann aber das Phasenkontrastbild dem Hellfeld überlegen sein; das ist der Fall, wenn 1. die Objekte sphärische Zellen ausbilden, wie z. B. die Nostocaceen *Anabaena* und *Cylindrospermum* und 2. zur Verbesserung des optischen Bildes, vor allem der Beseitigung des Phasenhofes,

der Brechungsindex des Substrates erhöht wird (MÜLLER, 1956). Das optisch günstigste Medium für die untersuchten Arten ist eine 35%ige Wasser-Gelatine (Abb. 1). Die Zellen bleiben darin aber nur einige Stunden am Leben. Dann schrumpfen sie plötzlich und erscheinen homogen grau, ohne noch eine Differenzierung erkennen zu lassen. Für längere Beobachtung empfiehlt sich die Verwendung einer 20—25%igen Gelatine. Nach etwa 6—8 Std verringert sich die Schärfe des optischen Bildes etwas. Diese Erscheinung ist wahrscheinlich auf die Ausscheidung von Schleim zurückzuführen.

Dauerbeobachtungen im wässrigen Medium werden durch die Eigenbewegung, die fast alle fädigen Blaulalgen ausführen, sehr erschwert. Man kann zwar durch verschiedene Substanzen wie z. B. 2,4-Dinitrophenol, Narkotica und Schwermetallsalze die Bewegung sistieren, hemmt damit aber gleichzeitig die Zellteilung.

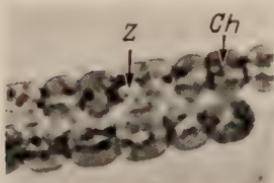


Abb. 1

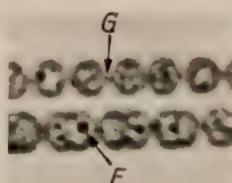


Abb. 2a

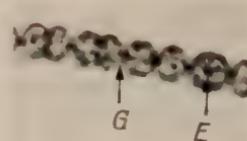


Abb. 2b

Abb. 1. *Cylindrospermum licheniforme*. Lebend, auf 35%iger Gelatine. Z Centroplasma; Ch Chromatoplasma. Deutlich sind die Längs- und Querwände zu erkennen. Phako, 1100:1

Abb. 2a u. b. *Anabaena variabilis*. G Granula; E Große Einschlüsse. Phako, 1000:1

Trotz der genannten und noch zahlreicher anderer Schwierigkeiten, die sich einer Dauerbeobachtung der lebenden Zelle entgegenstellen, kann auf sie aus naheliegenden Gründen nicht verzichtet werden (GEITLER, 1955).

Bei *Anabaena variabilis* Kütz.¹ läßt sich deutlich ein ungefärbtes Centroplasma vom peripheren, gefärbten Chromatoplasma unterscheiden. Das Centroplasma kann ein geschlossener Zellbezirk sein oder aber von Fortsätzen des Chromatoplasmas durchzogen werden (Abb. 2a). Im Chromatoplasma liegen Granula, die einen mittleren \varnothing von $0,3 \mu$ besitzen (Abb. 2a u. b). Häufig sind nach erfolgter Durchschnürung der Zelle an der Querwand 2 oder 4 dieser Granula angeordnet (Abb. 2b). In Aqu. dest. oder bei Luftabschluß unter dem Deckglas vergrößern sich die Granula nach einer gewissen Zeit und erscheinen dann als stark lichtbrechende, schwach gelbliche Körnchen. Im Dunkelfeld leuchten sie auf. Eine Teilung der Granula konnte bisher nicht beobachtet werden.

Im Bereich des Centroplasmas liegen 1—2, gelegentlich auch mehrere große, kugelige und gegen das umgebende Plasma scharf abgegrenzte Einschlüsse (Abb. 2a, 3). Sie sind in den „Plasmasträngen“, die das Centroplasma durchziehen, angeordnet und haben einen mittleren \varnothing von $1,3 \mu$. Sie sind farblos. An einzelnen Zellen läßt sich erkennen, daß diese

¹ Kultur auf Glasfilterplatten (DREWS, 1955a). Nährlösung (nach der Literatur): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,04%; KNO_3 0,04%; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,04%; CaCl_2 0,001%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%.

Einschlüsse im Innern oft nicht homogen sind, sondern körnige Partikel enthalten (Abb. 3). Eine Teilung ließ sich nicht beobachten. Doch kam es vor, daß diese Gebilde nach einigen Stunden optisch nicht mehr nachweisbar waren.

Cylindrospermum licheniforme Kütz. entspricht im Aufbau seiner normalen vegetativen Zellen weitgehend *A. variabilis*. Das Centroplasma ist jedoch langgestreckt und reicht oft bis zu den Querwänden (Abb. 4).

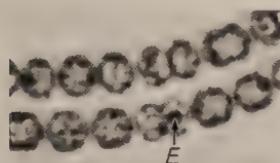


Abb. 3. *Anabaena variabilis*. E Großer Einschluß mit Körnchen im Innern. Phako, 1100:1

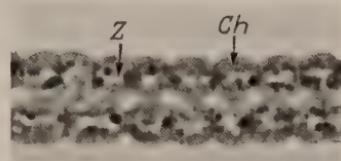


Abb. 4. *Cylindrospermum licheniforme*. Z Centroplasma; Ch Chromatoplasma. Phako, 1100:1

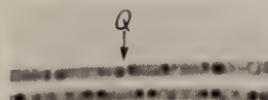


Abb. 5. *Phormidium frigidum*. Q Querwand. Phako, 1500:1

Phormidium retzii Gom.¹. Die Granula dieser Art liegen im Chromatoplasma der Zelle verstreut. Im Alter treten in den Zellen spaltenförmige Hohlräume auf, die mit Gas gefüllt zu sein scheinen.

Phormidium frigidum Fritsch ist eine sehr schmale, gut bewegliche Art². An den Enden der Zellen liegen, bevorzugt in unmittelbarer Nähe der Querwände, 1—2 im Phasenkontrast dunkel erscheinende Granula (Abb. 5). Das Centroplasma durchzieht als schmaler, im Phasenkontrast hell erscheinender Raum fast die gesamte Zelle. In seinem Bereich finden sich gelegentlich dunkle Körnchen.

Oscillatoria limosa Ag. ist, bedingt durch die Dicke der Trichome (\varnothing über 10μ) und die starke bräunliche Pigmentierung, für cytologische Untersuchungen kein günstiges Objekt. Im Phasenkontrast erkennt man ein stark gegliedertes Centroplasma, das häufig mit lakunen- bis blasenartigen Räumen, keinen Vacuolen, in Verbindung steht. An der Querwand sind Granula angeordnet.

¹ (Breite der Trichome $4,5 \mu$, Länge der Zellen $3,5$ — $4,5 \mu$) wurde zusammen mit *Ph. frigidum* aus einem Wasserplanzenbecken der Warmhäuser im Jenaer Botanischen Garten isoliert. Die Art bildet lebhaft blaugrün gefärbte Lager.

² Die Länge der Zelle beträgt $2,5$ — $3,0 \mu$, die Breite etwa $1,3 \mu$.

Elektronenmikroskopische Befunde

Ultradünnschnitte der genannten Arten zeigen bei elektronenmikroskopischer Betrachtung, daß die im Chromatoplasma von *An. variabilis* und *Cyl. licheniforme* liegenden Granula eine deutliche Strukturierung besitzen (Abb. 6a u. b).

Man erkennt ein System von dunklen Linien, die hellere Zwischenschichten einschließen. Die einzelne kontrastreiche Linie hat eine Breite von etwa 50 Å. Gelegentlich kann man beobachten, daß sie in einzelne Körnchen aufgelöst ist, die perl schnurartig aneinander hängen (Abb. 7a u. b). Die Auswertung zahlreicher, in verschiedenen Richtungen geführter Schnitte ergibt, daß die Granula von Lamellen durchzogen werden, die in den Abbildungen als dunkle Linien erscheinen. Die Lamellen sind häufig parallel zueinander angeordnet (Abb. 6a). Oft laufen sie aber auch unregelmäßig und sind gefaltet. Im Schnitt erscheinen sie dann als perl schnurartige Reihen. Diese Unterschiede im Erscheinungsbild sind auf die verschiedenen Schnittrichtungen zurückzuführen. Gegen das umliegende Plasma ist das Granulum durch eine cytoplasmatische Grenzschicht ab-

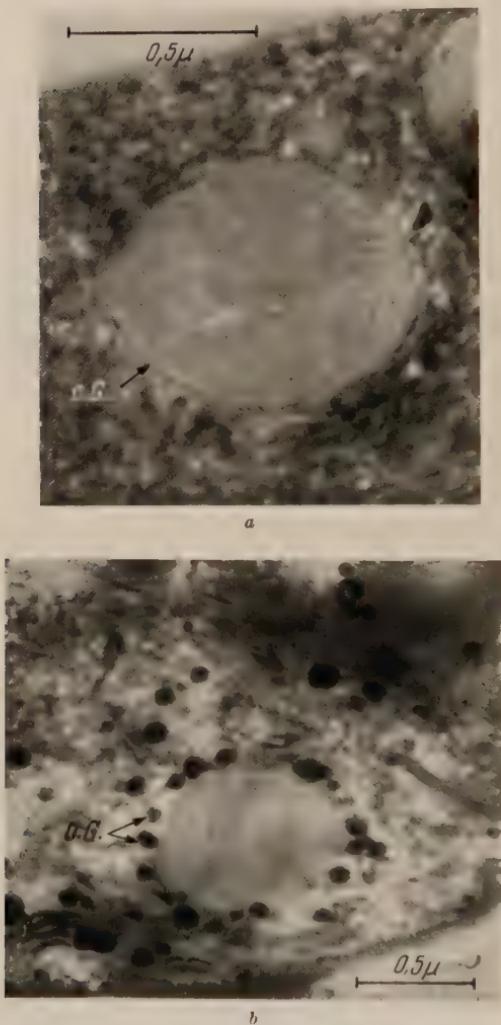


Abb. 6a u. b. *Cylindrospermum licheniforme*. Strukturiertes Granulum mit cytoplasmatischer Grenzschicht (c. G.), elektronenoptisch, o. G. osmophile Granula. Originalaufnahme 8700:1; nachvergrößert

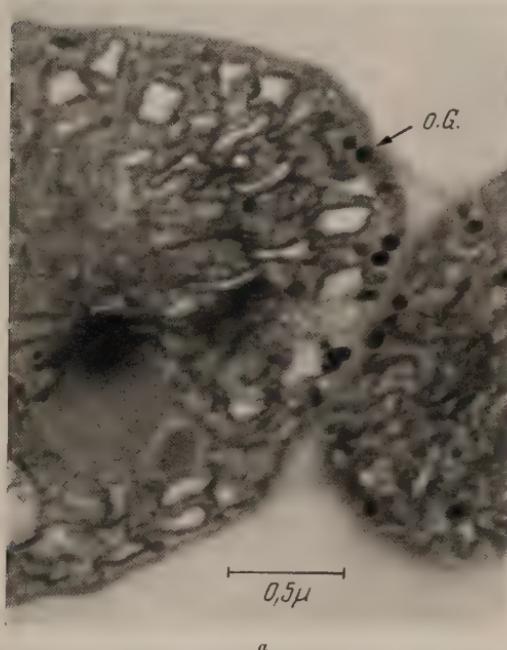
getrennt (Abb. 6a, c G). Der \odot der Granula schwankt zwischen 100 und 600 $m\mu$; er beträgt im Durchschnitt etwa 300 $m\mu$.

Bei *Osc. limosa* treten die gleichen Granula im Bereich der Querwand auf. Bei *Ph. retzii* liegen sie verteilt im Chromatoplasma. Die Strukturierung ist bei beiden Arten vorhanden, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den untersuchten Nostocaceen.

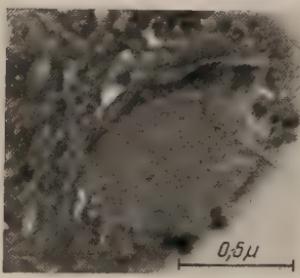
In den langen Zellen von *Ph. frigidum* liegen die genannten Granula an den Querwänden (Abb. 8. G). Sie besitzen eine ausgeprägte Strukturierung (Abb. 9).

Die Einzellamelle hat etwa den gleichen \varnothing wie die Lamellen der oben beschriebenen Granula. Die Lamellen scheinen untereinander netzartig verbunden zu sein.

Außer diesen strukturierten Granula liegen in den Zellen unregelmäßig



a



b

Abb. 7 a u. b. *Cylindrospermum licheniforme*. Strukturiertes Granulum und osmophile Granula (o.G.) besonders an der Querwand. Original 8700:1; nachvergrößert

geformte Körnchen (Abb. 8, P). Sie wirken stark elektronenstreuend. Bei starkem Elektronenbeschuß zeigen sie Sublimationserscheinungen (KÖNIG u. WINKLER, 1948). Sie können einen \varnothing von $400 \text{ m}\mu$ erreichen. Wahrscheinlich sind es die aus kondensierten Phosphaten aufgebauten metachromatischen Körnchen (Metachromatinkörper?). Bei *Ph. frigidum* liegen sie im Centroplasma hinter den strukturierten Granula zur Zellmitte hin (Abb. 8, P). Bei den übrigen Arten lassen sie keine besondere Anordnung erkennen. Sie sind verstreut im Chromatoplasma oder an der Grenze zum Chromatoplasma zu finden.

Neben den genannten Zelleinschlüssen treten bei allen untersuchten Arten peripher liegende, kleine, stark osmophile Granula auf, die einen \varnothing von etwa $40 \text{ m}\mu$ besitzen. Sie lassen keine Strukturierung erkennen.

Häufig liegen sie unmittelbar der Zellwand, vor allem der Querwand an (Abb. 7 a o. G.). Gelegentlich findet man sie auch verteilt im Chromatoplasm oder in unmittelbarer Nähe der strukturierten Granula (Abb. 6 b).

Färbungen

Janusgrün. In zahlreichen Arbeiten an pflanzlichen und tierischen Objekten wird eine selektive Anfärbung der Mitochondrien mit Janusgrün beschrieben (DRAWERT, 1953; GUILLIERMOND, 1949; LAZAROW u. COOPERSTEIN, 1953; MILLERD u. BONNER, 1953; SHOWACRE u. DU BUY, 1955). In vitro-Versuche mit isolierten Säugetiermitochondrien ergaben, daß für die sich an die Farbaufnahme anschließende Reduktion des Farbstoffes zum Diäthylsafranin und Leukosafranin die Krebszyklus-Dehydrogenasen (SHOWACRE u. DU BUY, 1955) und die Flavin-Enzyme (LAZAROW u. COOPERSTEIN, 1953) verantwortlich zu machen sind. Die pflanzlichen Mitochondrien scheinen eine ähnliche Ausstattung an Fermenten wie die tierischen aufzuweisen (MILLERD u. BONNER, 1953) und ebenfalls den Farbstoff zum Leukosafranin reduzieren zu können (DRAWERT, 1953).

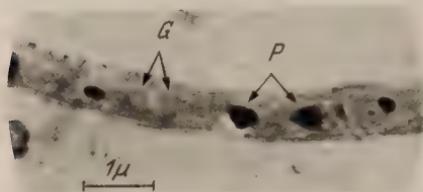


Abb. 8. Längsschnitt durch *Phormidium frigidum* mit strukturierten Querwandgranula (G) und Phosphatgranula (P). Original 8700:1; nachvergrößert

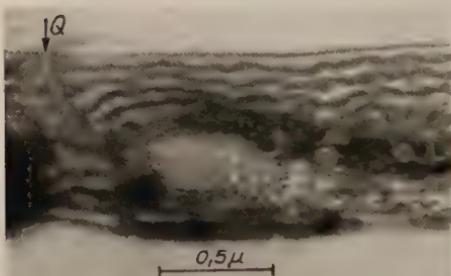


Abb. 9.
Phormidium frigidum. Strukturierte Querwandgranula.
Q Querwand. Original 8700:1; nachvergrößert

allem bei Phanerogamen die Färbung oft recht wechselseitig ausfällt (GUILLIERMOND, 1923). Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Färbung können unter anderem veränderte Sauerstoffspannung und Wechsel des pH-Wertes verantwortlich gemacht werden (DRAWERT, 1953; SHOWACRE u. DU BUY, 1955).

Janusgrün wurde bisher kaum für färberische Untersuchungen an Blaualgen verwendet. GONCALVES DA CUNHA (1935) beobachtet bei mehreren Arten mit Janusgrün eine Anfärbung des Zentralkörpers und kleiner Granula. Dimensionen und Aussehen dieser blaugefärbten Granula veranlaßt GONCALVES DA CUNHA zu der Annahme, daß es sich um Mitochondrien handelt. Bei *Ph. uncinatum* wurde an bestimmten, der Querwand anliegenden Granula eine Reduktion des Farbstoffs zu Diäthylsafranin beobachtet (DREWS u. NIKLOWITZ, 1956).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Janusgrün B Grübler, Leipzig, Janusgrün, holländisches Präparat, und Janusgrün B Bayer verwandt. Mit Chloroform läßt sich, wie auch die Versuche von DRAWERT zeigen, aus wäßrigen Lösungen

ein mehr oder weniger großer Teil ausschütteln. Die Höhe des Anteils richtet sich im wesentlichen nach dem pH-Wert. Im allgemeinen geht im alkalischen Bereich mehr Farbstoff ins Chloroform als im sauren. Die rote Reduktionsstufe bleibt beim Ausschütteln zum großen Teil in der wäßrigen Phase, wenn mit NaHSO_3 oder Ascorbinsäure reduziert wird. Mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ läuft die Reduktion wesentlich rascher ab. Der dabei entstehende Farbstoff geht zum großen Teil ins Chloroform.

DRAWERT (1953) gibt an, daß nur bei günstigster Sauerstoffversorgung eine Chondriosomenfärbung zu erzielen ist. Die Blaualgen wurden daher in flachen Petrischalen der Einwirkung des Farbstoffs (1:10000, verdünnte Nährlösung) ausgesetzt. Schon nach kurzer Zeit (zum Teil schon nach 10 min) kann eine Blaufärbung beobachtet werden. Es färbt sich das Centroplasma, später die Zellwand und schließlich das gesamte Plasma. Eine Färbung der im Chromatoplasma liegenden Granula ist nur selten zu beobachten. Eine Änderung des pH-Wertes (pH 5,0 bis 8,0) hat keinen sichtbaren Einfluß.

Bei stärkerer Verdünnung (1:100000 bis 1:200000) findet dagegen wesentlich häufiger, aber auch nicht regelmäßig, eine Speicherung von Janusgrün in den Granula statt. Die Färbung ist im allgemeinen schwach. Die Granula, die sich färben, liegen bei *Anabaena* und *Cyl. licheniforme* verstreut im Chromatoplasma besonders an den Querwänden, bei *Ph. frigidum* am Ende der langgestreckten Zelle, vereinzelt auch an den Längswänden. Bei *Ph. retzii* liegen die Granula im Chromatoplasma und an den Querwänden und bei *Osc. limosa* ebenfalls an den Querwänden. Die Janusgrün-speichernden Granula sind mit den oben näher beschriebenen, strukturierten Granula identisch.

Eine Anfärbung des Centroplasmas kann auch bei hohen Verdünnungen gelegentlich beobachtet werden. Sie tritt aber wesentlich seltener und nur dann auf, wenn die Organismen nicht mehr voll lebensfähig sind. Eine Schädigung der Trichome erkennt man daran, daß sie sich nicht mehr bewegen, in den Zellen eine Vacuolisierung oder Entmischung stattfindet und sich das Chromatoplasma entfärbt. Niemals konnte eine Blaufärbung des Centroplasmas und anderer Teile der Zelle an völlig intakten Trichomen beobachtet werden.

Bei ungehindertem Sauerstoffzutritt bewirkt also Janusgrün in relativ hohen Konzentrationen (1:10000) eine Schädigung, die sich in der oben beschriebenen postvitalen Blaufärbung äußert. Am raschesten färben sich abgestorbene oder schon vor Beginn der Färbung geschädigte Zellen. Bei starker Verdünnung (1:100000 und höher) wird der Farbstoff von einem Teil des untersuchten Materials in den Granula gespeichert, besonders häufig bei *Cyl. licheniforme*.

Eine Reduktion des Farbstoffs kann nur bei Luftabschluß der Präparate beobachtet werden. Die Trichome werden in die Farblösung (1:10000 in verdünnter Nährlösung, pH 6,9) gebracht, das Präparat mit Deckglas und Paraffin-Vaseline abgeschlossen und im Dunkeln gehalten.

Unter diesen Bedingungen färben sich bei *Ph. frigidum* fast regelmäßig nach einer Zeit von 30 min bis zu mehreren Stunden die endständigen Granula rot an. Während *Allium cepa*-Zellen im lebenden Zustand niemals eine rote Färbung der Chondriosomen erkennen lassen (DRAWERT, 1953), tritt die Färbung gerade in solchen Trichomen zuerst auf, die sich noch in lebhafter Bewegung befinden. Ganz allgemein kann die Reduktion an jungem, sich bewegendem Material eher beobachtet werden als an alten, kaum noch kriechenden Fäden.

Bei den anderen Arten findet eine Rotfärbung der Granula nicht so regelmäßig statt. Sie tritt häufig erst dann ein, wenn das Deckglas abgehoben und die Trichome einige Minuten der Luft ausgesetzt sind, das Leukosafranin also zum roten Safranin reoxydiert wird. Rotgefärbte Granula sind bei den untersuchten *Nostocaceen* und den übrigen *Oscillatoriaceen* ebenfalls nur in solchen Zellen zu finden, die keinerlei morphologisch erkennbare Schädigung aufweisen und in den übrigen Zellbestandteilen völlig ungefärbt bleiben. Bei den abgeschlossenen Präparaten wird der in die Zelle eindringende Farbstoff in den Granula nur selten in der oxydierten Stufe gespeichert, meist wird er sofort reduziert.

Bei längerem Deckglasabschluß, etwa nach 12—48 Std quellen die Granula auf, daneben werden gelbliche Entmischungstropfen sichtbar und das Chlorophyll verändert sich (Gelbfärbung). Die gleichen Veränderungen treten auf, wenn die Algen im Deckglaspräparat in Nährösungen eingeschlossen werden.

Die Anwendung verschiedener Janusgrünpräparate führt im allgemeinen zu den gleichen Ergebnissen. Unterschiede in der Dauer der Reduktion lassen sich den verschiedenen Herkünften nicht eindeutig zuordnen.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die im Bereich des Chromatoplastemas liegenden, strukturierten Granula unter bestimmten Voraussetzungen selektiv Janusgrün zu speichern vermögen. Bei Luftabschluß wird Janusgrün zu Diäthylsafranin reduziert. Der rote Farbstoff kann in intakten Zellen ebenfalls nur in den Granula beobachtet werden. In geschädigten oder abgestorbenen Zellen dagegen wird der blaue Farbstoff bevorzugt im Centroplasma und der Membran gespeichert, der rote dagegen findet sich gelegentlich diffus in der Zelle verteilt. Versuche, durch Hemmung des Cytochromsystems auch in Gegenwart des Luftsauerstoffs eine Reduktion von Janusgrün zu erreichen, führten zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Tetrazoliumchlorid-Reduktion

Es ist bekannt, daß reduzierende Systeme in der lebenden Zelle Tetrazoliumsalze zu gefärbten Formazanen zu reduzieren vermögen (KUHN u. JERCHEL, 1941). Vor allem werden Dehydrogenasen und Diaphorase für die enzymatische Umwandlung verantwortlich gemacht (ANDERSON, 1955; BRAUN-FALCO u. RATJENS, 1954;

BRODIE u. GOTS, 1953); aber auch nicht enzymatische Systeme, wie Sulphydrylgruppen sollen Tetrazoliumsalze unter physiologischen Bedingungen reduzieren können (ROBERTS u. LUCCHESE, 1955; BARNETT u. SELIGMAN, 1952, 1954). Letzteres ist jedoch noch problematisch (FINDLAY, 1955; GOMORI, 1952).

Schwierig und keinesfalls summarisch zu beantworten ist die Frage der Lokalisation des Formazans. Ist das Formazan wie das des 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorids lipoidlöslich, so besteht die Gefahr einer sekundären Verlagerung des Reduktionsproduktes in die lipoide Phase der Zelle (WEIBULL, 1953; ZIEGLER, 1953). Das Formazan kann sich aber auch in Form von Kristallen oder unregelmäßigen Gebilden, die z. T. inneren Oberflächen, wie Membranen, Lamellen, allgemein Grenzflächen folgen, ablagern (DRAWERT u. TISCHER, 1956; DREWS u. NIKLOWITZ, 1956; FINDLAY, 1954). Der physiologische Zustand der Zellen, chemische Zusammensetzung und Menge der Elektrolyte im Medium und dessen eH, Lichteinwirkung während des Versuches sowie die chemische Beschaffenheit des verwendeten Tetrazoliumsalzes können von Einfluß auf Stärke und Art der Formazanbildung sein (CASCARO u. ZWEIFACH, 1955; CURRIER u. VAN DER ZWEEP, 1955; DREWS, 1955b).

Untersuchungen an *Ph. uncinatum* hatten ergeben, daß an den Granula, die im Bereich der Querwand liegen, primär Formazan abgelagert wird (DREWS u. NIKLOWITZ, 1956). Später treten Sekundärbildungen auf. DRAWERT u. TISCHER (1956) geben an, daß bei einigen Nostocaceen das Formazan zunächst an Granula und dann in Kristallen abgelagert wird.

Um das Verhalten der oben genannten Arten gegenüber Tetrazoliumsalzen zu prüfen, wurde mit verschiedenen Präparaten gearbeitet. Vorrangig verwendeten wir ein Stilben-TC^{1,2}, dessen blaues Formazan kaum lipoidlöslich ist³. Zum Vergleich dienten 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck, TTC) und 2,2'-p-(Di-o-methoxy)-diphenylen-3,3',5,5'-tetraphenyl-ditetrazoliumchlorid² (BTC).

Die Tetrazoliumsalze wurden in einer Konzentration von 0,05 bis 0,001% in einer mit Veronal-Acetatpuffer (0,0014 mol, pH 7,3) 1:2 verdünnten Nährlösung angewendet. Die Algen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem Tropfen auf dem Objektträger suspendiert und dann mit Deckglas und Paraffin-Vaseline von der Luft abgeschlossen. Bis zur Beobachtung lagen die Präparate im Dunkeln. Die Reduktion unter Luftabschluß im Dunkeln lief im allgemeinen wesentlich rascher ab als in offenen Schälchen, die im Tageslicht standen, und ergab häufig auch etwas andere Resultate.

Bei Verwendung von TTC (0,02%) konnte unter Umständen schon nach 10 min in den vegetativen Zellen von *Cyl. licheniforme* eine Reduktion beobachtet werden. In den meisten Zellen zeigten die Granula eine schwache, aber deutliche Rotfärbung (Abb. 10a). Eine Kristallbildung

¹ 4,4'-Bis-(3,5-diphenyl-tetrazolium-(2)-chlorid) Stilben.

² Für Herstellung und freundliche Überlassung des Präparates danken wir Herrn Diplomchemiker HERB.

³ Die Verb. zeichnet sich auch durch eine geringe Lichtempfindlichkeit aus; vgl. dagegen BAJUSZ (1956).

an den Granula oder anderen Zellstrukturen war nicht festzustellen. Daneben entstanden in anderen Zellen etwas später große Kristalle, deren Ablagerung keine Beziehung zu zelleigenen Strukturen erkennen ließ (Abb. 10 b). Die Granula in Abb. 10 b sind ungefärbt und daher nicht deutlich zu erkennen.

Stilben-TC wird ebenfalls rasch reduziert. Als optimal erwies sich eine Konzentration von etwa 0,005 %. Unter 0,001 % kann nur in Ausnahmefällen noch eine stark verzögerte Reduktion beobachtet werden. Bei der angegebenen Konzentration erkennt man nach etwa 10—20 min deutlich Formazanablagerungen an oder in den Granula (Abb. 11 a u. b). Gleichzeitig, zumeist aber später entstehen von den Granula aus oder

im Chromatoplasma längliche, unregelmäßige Gebilde. Liegen die Blaualgen in offenen Schälchen, die dem Licht ausgesetzt sind, so ist außer einer Verzögerung der Reduktion

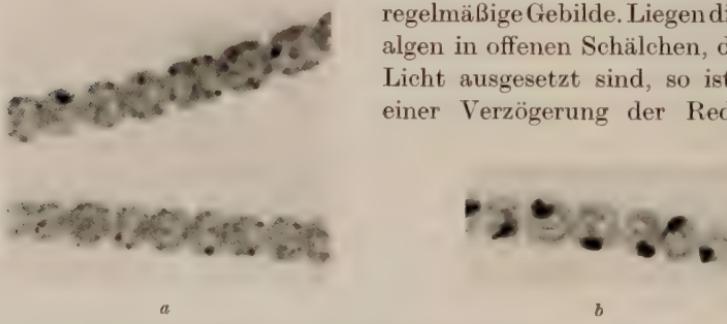


Abb. 10. *Anabaena variabilis*. TTC-Reduktion, a Speicherung in den Granula, b Kristallbildung. 1100:1

zu beobachten, daß vorwiegend oder ausschließlich lange Ablagerungen gebildet werden.

In BTC-Lösung speichert *Cyl. licheniforme* das blaue Formazan ebenfalls in den Granula. Später treten dann kürzere, unregelmäßig geformte Ablagerungen auf (Abb. 12).

Bei *An. variabilis* lagert sich das Stilben-Formazan primär in den Granula ab und später auch noch in Form unregelmäßiger Gebilde im Chromatoplasma (Abb. 13). Häufig ist der Verlauf der Reduktion gegenüber *Cyl. licheniforme* etwas verzögert. In TTC-Lösung (0,02 %) wird nach 10 bis 15 min in den Granula der vegetativen Zellen Formazan gespeichert. Die ersten Kristalle sind nach 20 min zu sehen. Ihre Ausbildung bleibt aber zunächst auf einen kleinen Teil der Zellen beschränkt. Erst bei mehrstündiger Einwirkung ist in zahlreichen Zellen Kristallbildung zu beobachten.

Ph. frigidum speichert Triphenyl-Formazan in den endständigen Granula. Schon nach 10 min (TTC 0,02 % ig, Luftabschluß) ist eine schwache, aber deutliche Rotfärbung der genannten Zellorganellen zu erkennen. Die Kristallbildung beginnt nach etwa 20 min. Zumeist findet in den Zellen, die Kristalle ausbilden, keine Speicherung in den Granula statt. Wird *Ph. frigidum* in Stilben-TC-Lösung suspendiert, so beginnt fast

regelmäßig die Ablagerung von Formazan in den endständigen Granula. Später treten dann auch im Chromatoplasma längliche Gebilde in Erscheinung.

Auch bei *Ph. retzii* wird bevorzugt in den an der Querwand und im Chromatoplasma gelegenen Granula Stilben-Formazan abgelagert. Ebenso verhält sich *Osc. limosa*. In beiden Arten können auch lange Formazankristalle gebildet werden. In TTC-Lösung bildet *Ph. retzii* vorwiegend Kristalle; *Osc. limosa* speichert in geringem Umfang rotes Formazan in den Querwandgranula und bildet daneben große Kristalle aus.

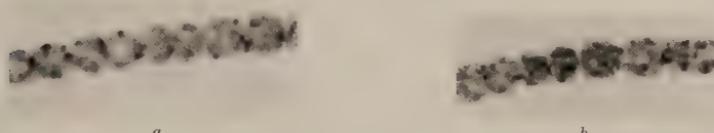


Abb. 11. *Cylindrospermum licheniforme*. Stilben-TC-Reduktion. Ablagerung in den Granula. 1100:1

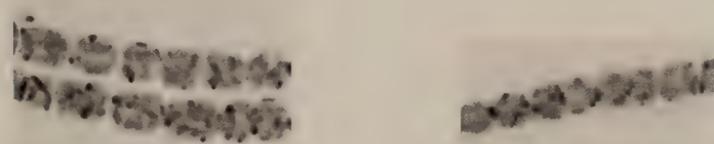


Abb. 12. *Cylindrospermum licheniforme*. BTG-Reduktion. Ablagerung des Formazans fast ausschließlich in den Granula. 1100:1

Abb. 13.
Anabaena variabilis. Stilben-TC-Reduktion. 1100:1

Nadi-Reaktion

Die zur Untersuchung kommenden Trichome werden in das nach PERNER (1952) angesetzte Nadi-Reagens¹ gelegt und von Zeit zu Zeit Proben zur Kontrolle entnommen. In einigen Fällen wurde der Ablauf der Reaktion auch direkt auf dem Objektträger verfolgt.

Im günstigsten Falle ist nach etwa 15 min, unter Umständen aber erst nach 1—2 Std, im Durchschnitt nach etwa 30 min eine Blaufärbung der Granula in den vegetativen Zellen von *Cyl. licheniforme* zu beobachten (Abb. 14). In Übereinstimmung mit den Angaben von DRAWERT u. TISCHER (1956) wird die Färbung in den Heterocysten wesentlich früher sichtbar. Zumeist speichern alle Granula der vegetativen Zellen, niemals aber die großen Einschlüsse Indophenolblau. Gelegentlich färben sich jedoch nur einzelne Granula an, andere hingegen nehmen kein Indophenolblau auf. In anderen Zellen wiederum treten neben den gefärbten Granula winzige blaue Tröpfchen auf, die sich allmählich vergrößern, so daß nach etwa 2 Std die Zellen mit blauen Körnchen vollgestopft

¹ 8 T. Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,05 mol; 1 T. 0,1%ige α -Naphthol-Lösung, wäßrig; 1 T. 0,1%ige Dimethyl-p-phenylenediamin-Lösung.

sind. Die Stärke und Art der Färbung kann von Zelle zu Zelle und von Trichom zu Trichom variieren.

Ein Zusatz von $2 \cdot 10^{-3}$ mol NaN_3 verzögert die Reaktion stark, $5 \cdot 10^{-3}$ mol KCN hemmt sie vollständig (Beobachtungszeit 3 Std).

Fixiert man die Trichome (Formol- CaCl_2), so tritt nach 1 Std eine schwach diffuse Blaufärbung der Zellen von *Cyl. licheniforme* und nach 2 Std eine kräftige Färbung der Granula ein. Gegenüber der Kontrolle mit lebendem Material ist die Indophenolblauspeicherung verzögert. Bei fixiertem Material färbt sich also nur ein Teil der Granula; daneben tritt noch eine tröpfchenförmige Speicherung auf.

Bei *Ph. frigidum* färben sich, wenn lebendes Material verwendet wird, zunächst die endständigen Granula. Erst wesentlich später entstehen



Abb. 14. *Cylindrospermum licheniforme*. Nadi-Reaktion. 1100:1

entlang der Längswände kleine, blaue Tröpfchen, wie man sie auch bei Färbung fixierter Zellen erhält.

Ähnlich verhalten sich auch die anderen Arten. Die Färbung fixierter Zellen stimmt hinsichtlich des Ortes und der Dauer der Färbung nicht völlig mit der Nadi-Reaktion an lebendem Material überein. Es soll später versucht werden, die genannten Erscheinungen zu deuten.

JOYET-LAVERGE (1934) verwendet zur Anfärbung von Chondriosomen reduziertes Methylenblau, das nach seiner Auffassung an den Zellorganellen oxydiert wird; nach einer gewissen Zeit soll die Färbung wieder verblassen, weil in dem sauren Milieu das Methylenblau nicht gespeichert werden kann (GUTZ, 1956).

Nach den Angaben von TARWIDOWA (1938) hergestelltes Leukomethylenblau führte bei Trichomen von *Cyl. licheniforme*, auch bei Variierung der Konzentration von Farbstoff und Reduktionsmittel (1:5000 bis 1:20000; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entspr.), zu keiner sichtbaren Anfärbung. Einmal werden die Zellen geschädigt, zum anderen erschwert die Eigenfarbe der Blaualgen das Erkennen einer schwachen Tingierung.

Fettfärbung

Das Ergebnis der Nadi-Reaktion läßt vermuten, daß ein Teil der Granula Lipide enthält. Mit Formol (Formol 1:10 + 0,5% CaCl_2 sicc.) fixierte Zellen von *An. variabilis* zeigen in Sudan III-Lösung¹ je nach Material eine deutliche, wenn auch nicht sehr kräftige Rotfärbung einzelner oder zahlreicher Granula. Bei *Cyl. licheniforme* speichern nur etwa 1–3 Granula je Zelle Sudan III. Die Sudanfärbung bei *Ph. frigidum* entspricht in ihrem Ergebnis der Indophenolblaufärbung fixierter Trichome: an den Längswänden liegen zahlreiche kleine rote Tröpfchen,

¹ Sudan III HOLLBORN, gesättigte Lösung in 50%igem Diacetin.

und die endständigen Granula zeigen eine schwache aber deutliche Anfärbung. Ähnlich verhält sich *Ph. retzii*. Mit Sudanschwarz B¹ färben sich die gleichen Strukturen wie mit Sudan III an. Die Färbung ist jedoch zumeist nicht sehr kräftig. *Cyl. licheniforme* zeigte keine sichtbare Speicherung von Sudanschwarz.

Wahrscheinlich sind neben anderen Lipoiden Phosphatide in den Granula enthalten. Der Nachweis (BAKER, 1946; GOMORI, 1953, S. 96) war positiv bei *Cyl. licheniforme*, *An. variabilis*, *Ph. retzii* und *Ph. frigidum*.

Verschiedene Färbungen und Nachweise

Die Granula aller untersuchten Arten vermögen verschiedene basische Farbstoffe (Azur I, Methylenblau, Toluidinblau, Konzentration 0,1 bis 0,5%, cH: schwach sauer bis neutral) zu speichern. Mit Toluidinblau und zum Teil auch Methylenblau färben sie sich metachromatisch. Von den Stoffen, die einen metachromatischen Effekt hervorrufen können (MICHAELIS, 1947; KRAMER u. WINDRUM, 1955; WALTON u. RICKETTS, 1954), darf hier in erster Linie wohl an kondensierte Phosphate gedacht werden. Nucleinsäuren, ATP und ADP sollen keine Metachromasie verursachen (SYLVESEN, 1954).

Ribonucleinsäure (RNS) scheint ebenfalls am Aufbau der Granula beteiligt zu sein (*Cyl. licheniforme*, *An. variabilis*). Bei der Mehrzahl der Beobachtungen wurde die Färbbarkeit der Granula mit Gallocyaninchromalaun (EINARSON, 1951) nach Ribonuclease (RN'ase)-Einwirkung gelöscht. In einem Fall blieb sie allerdings erhalten, obwohl andere Zellstrukturen sich nicht mehr färbten.

Mit den Methoden nach MACARY (1951) und WINDISCH u. Mitarb. (1953) lassen sich Phosphate und nach GOMORI (1953) alkalische Phosphatase nachweisen. Dieses Ergebnis bestätigt oder ergänzt die oben erwähnten Nachweise, sagt aber noch nichts über die Natur der Phosphorsäureverbindungen aus. Das elektronen-optische Bild spricht gegen eine starke Beteiligung von kondensierten Phosphaten am Aufbau der meisten Granula. Die Basophilie der Granula und ihre Größe bleiben auch nach Extraktion mit Äther-Alkohol (2:1) erhalten. Die Phosphatide müssen also in ein nichtfettlösliches Gerüst, wahrscheinlich Eiweiß, eingelagert sei. Das wird auch durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt.

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erwiesen sich die in dieser Arbeit genannten Arten als wenig geeignet. Die starke Eigenfluoreszenz des Chromatoplastemas überstrahlt oft die durch Fluorochrome erzielten Effekte. Von den verschiedenen Versuchen, durch geeignete Filterkombination und Farbstoffe eine Darstellung einzelner Strukturen zu erzielen, soll hier nur die Färbung mit Berberinsulfat (HOLBORN)

¹ Sudanschwarz B (Ceresschwarz Bayer), Lösung wie Sudan III.

erwähnt werden. Die Konzentration des Farbstoffs betrug 0,01—0,001 %, der pH-Wert 3,0—8,0. In Übereinstimmung mit GEISSLER (1955) konnte eine leuchtend gelbe Fluorescenz der Granula erzielt werden. Unterschiede in der Färbung, die sich auf den pH-Wert bzw. die Konzentration des Berberinsulfats zurückführen ließen, waren nicht zu beobachten. Das Chromatoplasma fluoresciert rötlich, das Centroplasma orangefarben. Die großen Einschlüsse zeigten keine Fluorescenz.

Centroplasma-Färbungen

Von den Untersuchungen über das Centroplasma verschiedener Blaualgen sollen im wesentlichen nur einige Beobachtungen an den beiden Nostocaceen mitgeteilt werden. Wie schon geschildert, liegen in dem hell erscheinenden, von „Plasmasträngen“ durchzogenen Centroplasma von *An. variabilis* und *Cyl. licheniforme* (Abb. 1, 2a u. 3) ein oder mehrere große Einschlüsse und auf den „Plasmasträngen“ kleine, dunkel erscheinende Granula.

In den großen Einschlüssen lässt sich mit Hilfe von Gallocyanin- bzw. Pyroninfärbung und RN'ase-Behandlung DNS nachweisen. Das Auftreten von Desoxyribonucleinsäure (DNS) in den großen Einschlüssen ist zweifelhaft. Die diffuse Gallocyaninfärbung im Bereich des Centroplasmas, die nach RN'ase-Einwirkung noch zu beobachten ist, bleibt aus, wenn nach RN'ase mit Pepsin bzw. Papain nachbehandelt wird. Sie tritt aber unverändert auf, wenn hintereinander RN'ase und DN'ase einwirken.

Die FEULGEN-Reaktion ergibt auch kein eindeutiges Bild, obwohl verschiedene Fixierungen, Hydrolysezeiten und Farbansätze erprobt wurden. Bei 60°C hydrolysierte Zellen zeigen niemals eine eindeutige Rotfärbung, auch nicht, wenn sie zur Fällung der Nucleoproteide mit Lanthannitrat oder Streptomycin vorbehandelt wurden. Nach einer Hydrolyse bei 4°C mit Perchlorsäure oder HCl (8—48 Std) war häufig eine diffuse Rotfärbung um die großen Einschlüsse und eine blasse Färbung einzelner, im Centroplasma gelegener Körnchen zu beobachten. Mitunter tritt diese Rotfärbung auch bei nicht hydrolysierten Zellen auf. Wahrscheinlich bewirkt schon die fuchsinschweißige Säure eine Hydrolyse. Nur einmal konnte nach Aufenthalt im FEULGEN-Reagens, ohne vorherige Hydrolyse, eine Anfärbung der großen Einschlüsse beobachtet werden.

Mit Gallocyanin oder Azur I + Thionylchlorid (DE LAMATER, 1951) färbt sich außer den genannten Strukturen auch der Bereich des Centroplasmas gleichmäßig an, ohne eine besondere Struktur darzustellen (Abb. 15a u. b). Diese Färbung bleibt bei Gallocyanin nach RN'ase-Einwirkung und bei Azur nach Hydrolyse (48 Std Perchlorsäure, 4°C; OsO₄-fixiert) erhalten. Die DNS ist also wahrscheinlich im Centroplasma verteilt. Eine genaue Lokalisierung ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich.

Die großen Einschlüsse enthalten neben der RNS noch kondensierte Phosphate in unterschiedlichen Mengen, die sich mit den oben genannten Methoden nachweisen lassen. Der Anteil an labilem Phosphat ist bei *An. variabilis* relativ hoch. Er beträgt 21% des Gesamtporphats (2 Wochen altes Material).

Phosphatide oder andere Lipoide treten in den großen Einschlüssen nicht auf.

Die färberischen Nachweise, die an anderen Blaualgen durchgeführt wurden, bestätigten die aus der Literatur bekannten Tatsachen: Im



Abb. 15a. *Anabaena variabilis*. Azur I-Färbung
nach Hydrolyse. 1100:1

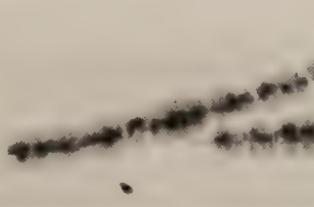


Abb. 15b. *Cylindrospermum licheniforme*.
Azur I-Färbung nach Hydrolyse. 1100:1

Bereich des Centroplasmas sind DNS und RNS lokalisiert. Ein Abgrenzen klar umschriebener Strukturen, die Träger einer oder beider Nucleinsäuren sind, war nicht möglich.

Diskussion

Im Chromatoplasma der untersuchten Arten läßt sich lichtmikroskopisch im wesentlichen nur eine Gruppe von Granula nachweisen, die eine submikroskopische Strukturierung aufweisen und einen Durchmesser von etwa $0,3 \mu$ haben. Sie speichern unter bestimmten Voraussetzungen Janusgrün sowie das reduzierte Diäthylsafranin. Rotgefärbte Granula treten nur in normal aussehendem, beweglichem Material auf, besonders bei *Ph. frigidum*. Bei den Oberepidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa* war dagegen eine Rotfärbung nur an geschädigten oder toten Zellen anzutreffen (DRAWERT, 1953). Bei den Zwiebelzellen wird der Farbstoff zunächst in den Chondriosomen gespeichert und wandert nach seiner Reduktion, wahrscheinlich auf Grund der höheren Lipophilie des Leukojanusgrün, schließlich in die Mikrosomen (DRAWERT, 1953).

Da bei den Blaualgen in der voll lebensfähigen Zelle sowohl Janusgrün als auch Diäthylsafranin nur in den Granula gespeichert wird, darf man wohl annehmen, daß der Farbstoff auch hier reduziert wird. Ein Auswandern des Farbstoffs aus den Granula auf Grund der unterschiedlichen lipophilen Eigenschaften der einzelnen Reduktionsstufen kommt kaum in Betracht. Die lamellenartige Strukturierung der Granula spricht

ebenfalls für das Auftreten von Fermenten in diesen Organellen. Der Feinbau der Granula ist zwar ein völlig anderer als der der Säugetier-mitochondrien (PALADE, 1953), dient aber sicherlich ebenfalls dem Prinzip der Oberflächenvergrößerung.

Eine weitere Bestätigung für die Anwesenheit reduzierender Fermente in den Granula gibt die TC-Reduktion. Das Stilben-Formazan ist im Gegensatz zum Triphenylformazan praktisch lipoidunlöslich. Eine Speicherung in den Granula auf Grund lipophiler Eigenschaften kommt daher wohl nicht in Betracht. Man könnte sich jedoch vorstellen, daß die Fermente im Chromatoplasma gleichmäßig verteilt sind und die Strukturen als Kristallisationskeime dienen, an denen sich die ersten Formazanablagerungen niederschlagen, die dann allmählich zu größeren Kristallen heranwachsen. Wie die submikroskopische Analyse zeigt, ist das gesamte Chromatoplasma von Lamellensystemen durchzogen (NIKLOWITZ u. DREWS, 1956). Es sind also genug Strukturen vorhanden, an denen sich Formazankristalle ablagnern könnten. Tatsächlich wird aber das Formazan fast regelmäßig zuerst in den Granula sichtbar, und von hier aus wachsen lange Ablagerungen ins Plasma. Da zudem auch ein Transport von Formazankristallen in der Zelle durch eine eventuelle Plasmaströmung nicht in Betracht kommt, darf wohl angenommen werden, daß die Granula Orte der Fermentlokalisation sind. Die Bildung der länglichen Ablagerungen, die keine Verbindung mit den Granula aufweisen, ließe sich auf reduzierende Systeme, die — analog zu den Chloroplasten (THOMAS u. a., 1954; NAGAI, 1955) — im Chromatoplasma lokalisiert sind, zurückführen.

Die Indophenolblausynthese läuft auch in Gegenwart von Luftsauerstoff ab, wird aber durch die lebende Zelle beschleunigt. Indophenolblau, das außerhalb der lebenden Zelle entstanden ist, kann in diese nicht eindringen, wohl aber in fixierte Zellen. Der lipophile Farbstoff wird in fixierten Zellen in den Granula und winzigen, meist peripher gelegenen Tröpfchen gespeichert. Es wäre denkbar, daß es sich hier um die submikroskopischen Granula handelt, die normalerweise im Lichtmikroskop nicht zu sehen sind, durch die Speicherung von Indophenolblau und Zusammenfließen zu größeren Tropfen aber sichtbar werden. Da in der lebenden Zelle diese tröpfchenförmige Speicherung nicht oder wesentlich später als die Anfärbung der Granula zu sehen ist, wäre es denkbar, daß die Cytochromoxydase ihren Sitz ebenfalls in den Granula hat und daher hier primär eine Färbung zu beobachten ist. Bevor jedoch diese Vermutung nicht durch weitere Nachweise bestätigt wird, kann über die Lokalisierung dieses Fermentes nichts ausgesagt werden.

Neben den hier diskutierten Granula liegen in den Zellen noch Körnchen, die — wie sich besonders bei *Ph. frigidum* zeigen ließ — sich vorwiegend aus kondensierten Phosphaten zusammensetzen. Diese Phos-

phatgranula erreichen einen Durchmesser von 300—400 m μ . Im Elektronenmikroskop zeigen sie bei starkem Elektronenbeschuß Sublimationserscheinungen. Bei Einwirkung von TES lösen sie sich auf. Ob zwischen den strukturierten und den Phosphatgranula eine nähere Beziehung besteht, etwa derart, daß die strukturierten Granula sich in Phosphatgranula umwandeln können, läßt sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht sagen.

Außer den großen strukturierten stellen die kleinen, osmiophilen Granula (\varnothing etwa 40 m μ) eine relativ selbständige Gruppe dar, die bei allen untersuchten Arten anzutreffen ist. Sie sind einheitlich in Größe, Aussehen und Verteilung in der Zelle. Übergangsformen zu den großen Granula, die auf eine engere Beziehung zwischen den beiden Formen bezüglich Herkunft und Vermehrung hindeuten, ließen sich nicht beobachten. In der Größenordnung entsprechen sie den Mikrosomen.

Die Untersuchung der großen Granula hat ergeben, daß diese Eigenschaften besitzen, die zum Teil an Mitochondrien erinnern. Die Unterschiede zu Mitochondrien, besonders in der Art der Strukturierung, und die bislang noch geringen Kenntnisse von weiteren Eigenschaften verwehren uns, diese Granula schon mit einem bestimmten Terminus zu versehen. Sie sollen daher nur als „fermentaktive Granula“ bezeichnet werden. Sie entsprechen in vieler Hinsicht den sogenannten Cyanophyceinkörnern, lassen sich aber nicht mit ihnen identifizieren.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß bei einigen Vertretern der Cyanophyceen wie bei höher organisierten Lebewesen einzelne Fermentsysteme an Strukturen gebunden sind. Es scheint so, als ob bestimmte Stoffwechselleistungen bei allen Organismen gesetzmäßig mit bestimmten Strukturen verknüpft sind, die zwar im einzelnen in ihrer Ausgestaltung variieren können, aber grundsätzlich den gleichen Bautyp zeigen.

Zusammenfassung

Im Chromatoplasma mehrerer Nostocaceen und Oscillatoriaceen liegen verstreut (*Anabaena variabilis*, *Cylindrospermum licheniforme*) oder vorwiegend an den Querwänden (*Oscillatoria limosa*, *Phormidium frigidum*) angeordnet Granula, die einen Durchmesser von etwa 0,3 μ haben. Sie besitzen im submikroskopischen Bereich eine lamelläre Strukturierung.

Die Granula von jungem Material speichern selektiv Janusgrün und die reduzierte Stufe, das Diäthylsafranin.

Die Formazane von drei verschiedenen Tetrazoliumsalzen werden primär ebenfalls an den Granula abgelagert oder in ihnen gespeichert.

Es wird aus den vorliegenden Versuchsergebnissen gefolgert, daß auf den Lamellen der Granula reduzierende Fermentsysteme lokalisiert sind. Die Granula wurden daher als „fermentaktive Granula“ bezeichnet.

Neben diesen „fermentaktiven Granula“ sind weiterhin bei den untersuchten Arten metachromatische Körnchen anzutreffen, die kondensierte Phosphate enthalten.

Außerdem sind an der Peripherie der Zelle, meist an der Wand anliegend, kleine, osmiophile Granula angeordnet. Sie haben einen Durchmesser von ungefähr $40 \text{ m}\mu$.

Im Centroplasma von *Anabaena variabilis* und *Cylindrospermum licheniforme* liegen große Einschlüsse, die RNS und kondensierte Phosphate enthalten. Die DNS ist wahrscheinlich im umliegenden Centroplasma lokalisiert.

Literatur

ANDERSON, A. D.: Determination of housefly succinic-dehydrogenase with TTC and NTC. Science (Lancaster, Pa.) **122**, 694 (1955). — ARIMA, J., K. YAMAMOTO, S. KAKIMOTO and Y. TAKAHASHI: The tetrazolium-reducing action of BCG I. Japan. J. Tuberc. **2**, 222 (1954).

BAJUSZ, E.: Die Bedeutung der V.V.-Bestrahlung für den histochemical Nachweis von Dehydrogenasen. Zeitschr. Vit. Hormon u. Fermentsch. **8**, 1 (1956). — BAKER, J.: The histochemical recognition of lipine. Quart. J. Microscop. Sci. **87**, 441 (1946). — BARNET, R. J., and A. M. SELIGMAN: Histochemical demonstration of protein-bound sulfhydryl groups. Science (Lancaster, Pa.) **116**, 323 (1952). — BRAUN-FALCO, O., u. B. RATJENS: Histochemische Darstellung der Bernsteinäuredehydrogenase. Dermat. Wschr. **130**, 1271 (1954). — BRODIE, A. F., and J. S. GOTS: The reduction of tetrazolium salts by an isolated bacterial flavoprotein. Science (Lancaster, Pa.) **116**, 588 (1952).

CAFRUNY, E. J., H. S. DiSTEFANO and A. FARAH: Cytophotometric determination of protein-bound sulfhydryl groups. J. Histochem. Cytochem. **3**, 354 (1955). — CASCARANO, J., and B. W. ZWEIFACH: Comparative histochemical and quantitative study of adrenal and kidney tissue by tetrazolium technique. J. Histochem. Cytochem. **3**, 369 (1955). — CASSEL, W. A., and W. G. HUTCHINSON: Nuclear studies on the smaller Myxophyceae. Exper. Cell. Res. **6**, 369 (1955). — COOPERSTEIN, S. J., and A. LAZAROW: Studies on the mechanism of Janus green B staining of mitochondria. Exper. Cell. Res. **5**, 82 (1953).

DELAMATER, E. D.: Stain Technol. **26**, 199 (1951). — DRAWERT, H.: Zellmorpholog. u. zellphysiol. Studien an Cyanophyceen. Planta (Berlin) **37**, 161 (1949). — Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 136 (1953). — DRAWERT, H., u. I. TISCHER: Über Redox-Vorgänge bei Cyanophyceen unter besonderer Berücksichtigung der Heterocysten. Naturwissenschaften **43**, 132 (1956). — DREWS, G.: Zur Kultur der Cyanophyceen. Naturwissenschaften **42**, 397 (1955a). — Zur Frage der TC-Reduktion durch Cyanophyceen. Naturwissenschaften **42**, 646 (1955b). — DREWS, G., u. W. NIKLOWITZ: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen, 2. Mitt. Arch. Mikrobiol. **24**, 147 (1956).

EINARSON, L.: On the theory of gallocyanin-chromalaun staining. Acta path. scand. (Copenh.) **28**, 82 (1951).

FINDLAY, G. H.: The value of some tetrazolium salts as histochemical reagents for sulfhydryl groups. J. Histochem. Cytochem. **3**, 331 (1955).

GEITLER, L.: Schizophyceen im Handbuch der Pflanzenanatomie. Berlin 1936. — Normale und patholog. Anatomie der Zelle im Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 1. Heidelberg 1955. — GOMORI, G.: Microscopic histochemistry. Chicago 1952. —

GONCALVES DA CUNHA, A.: Sur la signification du corps central des Cyanophycées. *C. r. Soc. Biol. (Paris)* **118**, 1122 (1935). — GUILLIERMOND, A.: Sur la coloration vitale des chondriomes. *C. r. Soc. Biol. (Paris)* **89**, 527 (1923). — La coloration vitale des chondriosomes. *Bull. Histol. appl.* **17**, 205 (1949). — GUTZ, H.: Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus*. *Planta (Berlin)* **46**, 481 (1956).

JOYET-LAVERGE, P.: Nouvelles méthodes générales pour la recherche du chondriome. *Cellule* **43**, 45 (1934).

KÖNIG, H., u. A. WINKLER: Über Einschlüsse von Bakterien und ihre Veränderungen im Elektronenmikroskop. *Naturwissenschaften* **35**, 136 (1948). — KRAMER, H., and G. M. WINDRUM: The metachromatic staining reaction. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 227 (1955). — KUHN, R., u. D. JERCHEL: Über Invertseifen VIII. *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **74**, 949 (1941).

LAZAROW, A., and S. J. COOPERSTEIN: Studies on the mechanism of Janus green B staining of mitochondria. *Exper. Cell. Res.* **5**, 56 (1953).

MACARY, J.: Des corpules métachromatiques des corynbactéries. *Ann. Inst. Pasteur* **81**, 657 (1951). — MICHAELIS, L.: The nature of the interaction of nucleic acids and nuclei with basic dyestuffs. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 131 (1947). — MILLERD, A., and J. BONNER: The biology of plant mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 254 (1953). — MÜLLER, R.: Zur Verbesserung der Phasenkontrast-Mikroskopie. *Mikroskopie (Wien)* **11**, 36 (1956).

NAGAI, S.: The reduction of silver nitrate by plant cells. *Protoplasma (Wien)* **44**, 444 (1955). — NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen, I. *Mitt. Arch. Mikrobiol.* **24**, 134 (1956).

PALADE, G. E.: An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 188 (1953).

ROBERTS, L. W., and G. LUCCHESE: Sulphydryl localization and tetrazolium reduction. *Stain Technol.* **30**, 291 (1955).

SCHUBERT, M., and D. HAMERMAN: Metachromasia. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 158 (1956). — SHOWACRE, J. L., and H. G. DU BUY: On the enzymic nature of mitochondrial characterization by Janus green B. *J. Nat. Cancer Inst.* **16**, 173 (1955). — SYLVÉN, B.: Metachromatic dy-substrate interactions. *Quart. J. Microsc. Sci.* **95**, 327 (1954).

TARWIDOWA, H.: Über die Entstehung der Lipoidtröpfchen bei Basidiobolus ranarum. *Cellule* **47**, 205 (1938). — THOMAS, J. B., L. C. POST and N. VERTREGT: Localisation of chlorophyll within the chloroplast. *Biochim. et biophysica Acta (Amsterd.)* **13**, 20 (1954).

WALTON, K. W., and C. R. RICKETTS: Investigation of the histochemical basis of metachromasia. *Brit. J. Exper. Path.* **35**, 227 (1954). — WEIBULL, C.: Observations on the staining of Bac. megal. *J. Bacter.* **66**, 137 (1953). — WINDISCH, F., D. STIERAND u. H. HAEHN: Über den Nachweis der Zellphosphate. *Protoplasma (Wien)* **42**, 345 (1953).

ZASTROW, E. M. VON: Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. *Arch. Mikrobiol.* **19**, 174 (1953). — ZIEGLER, H.: Reduktion of TTC in Pflanzenzellen. *Z. Naturforsch.* **8 b**, 662 (1953).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen an cellulosezersetzenden Pansenbakterien*

Von
RUTH HELWIG

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. August 1956)

Die Physiologie des Wiederkäuermagens, insbesondere der Vorgang der Cellulosezersetzung, ist schon seit langem Gegenstand eingehender Untersuchungen. TAPPEINER und ANKERSMIT schrieben die Fähigkeit, die in der Pflanzenzelle eingeschlossenen Nährstoffe freizusetzen, zunächst der Pansenflora zu. Demgegenüber glaubten REICHENOW und WEINECK in den Infusorien des Pansens Cellulosezersetzer sehen zu müssen (vgl. DOFLEIN u. REICHENOW, 1953). WESTPHAL (1934) konnte aber mit Hilfe exakter Kulturmethoden nachweisen, daß die aus dem Pansen isolierten Ciliaten bei Cellulose als einziger C-Quelle verhungern. HUNGATE (1947, 1950) gelang es zuerst, Reinkulturen von cellulosezersetzenden Pansenbakterien zu ziehen. Später: SIJPESTEIJN, 1951; HALL, 1952 aus Kaninchen; HUHTANEN, 1953, worauf noch zurückzukommen sein wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, reine Stämme cellulosezersetzender Pansenbakterien zu züchten und deren morphologischen und physiologischen Eigenschaften zu untersuchen.

Methodik

1. Gewinnung der Pansenproben

Rinderpansenproben wurden unmittelbar nach Schlachtung eines Tieres durch Anschneiden der Pansenwand und Auffangen des Inhalts in eine 1%ige Glucoselösung gewonnen. Schafpansenproben wurden vom lebenden Tier durch Aushebern des Pansens unter anaeroben Bedingungen gewonnen. Diese Entnahme erfolgte jeweils drei Stunden nach der Fütterung. Die Tiere waren 14 Tage vor Beginn der Versuche auf Heudiät gesetzt worden.¹

2. Kulturmethoden

In einem synthetischen Nährmedium waren die Bakterien nicht zu züchten. Die wichtigsten Faktoren für ein optimales Milieu sind: a) Strenge Anaerobiose (niedriges Redoxpotential), b) Einhaltung des Neutralbereichs (durch entsprechende Puffersysteme), c) Körpertemperatur des Wirtstieres (37°C), d) hochqualifizierte, stickstoffreiche Nahrung.

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation d. Mathem.-Naturw. Fakultät Göttingen 1956. Dort nähere Angaben über methodische Einzelheiten.

¹ Herrn Prof. Dr. LENKEIT und Herrn Dr. BRUNE vom Institut für Tierphysiologie und Tierernährung danke ich für die Überlassung und Pflege zweier Versuchstiere.

Die Nährösung nach HUHTANEN (1952)¹ entsprach weitgehend diesen Forderungen und wurde daher allen Untersuchungen zugrunde gelegt: Fleischextrakt 1,0%; Hefeextrakt 1,0%; Pepton 1,0%; Trypton 1,0%; K_2HPO_4 0,1%; KH_2PO_4 0,1%; Cystein-HCl 0,1%; $NaHCO_3$ 0,5%; Cellulosepulver 0,5%. Cystein-HCl und $NaHCO_3$ wurden als 10%ige Stammlösung steril filtriert und bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt. Sie wurden jeweils vor Beimpfung der Nährösung getrennt zugesetzt. Mit Hilfe des reduzierenden Agens war eine einfache und schnelle Kultivierung der Anaeroben möglich. Um die Stabilität der anaeroben Bedingungen möglichst lange zu erhalten, wurden die Kulturen während und nach der Beimpfung mit CO_2 begast und durch Paraffinstopfen verschlossen.

Zur Kultivierung auf Agar (2,0%) wurde die gleiche Zusammensetzung wie die der Nährösung gewählt, statt des Cellulosepulvers von Schleicher u. Schüll jedoch nach dem Prinzip der Kupferseideherstellung umgefällte Watte benutzt, um eine mikroskopisch feine Cellulosesuspension zu erhalten. Herstellung des $Cu(OH)_2$: 25 g $CuSO_4$ in 100 ml Aqua dest. gelöst, erhitzt, mit conc. NH_3 versetzt. Der ausfallende grüne Niederschlag nach gründlichem Wässern mit 7,5%iger KOH im Überschuß versetzt. Lösung der Cellulose: 4–5 g Watte in Cuoxam (3 g $Cu(OH)_2$ /250 ml conc. NH_3) bei 4 °C gelöst. Ausfällen: Die stark verdünnte Lösung mit verd. H_2SO_4 versetzt, die ausfallende Cellulose zur Beseitigung des Kupfers gewaschen.

3. Isolierungsmethoden

Von den drei morphologischen Typen, die in den Rohkulturen auftraten, wurden mit Hilfe des Mikromanipulators Einzell-Kulturen angelegt². Sporenbildner und Kokken konnten im Hängetropfen mit *Bact. prodigiosum* zusammen zur Entwicklung gebracht und in flüssige Kultur übertragen werden; der cellulosezersetzende Nichtsporenbildner wurde dagegen unmittelbar nach der Isolierung mit dem Tropfen in die Nährösung übertragen.

4. Untersuchungsmethoden

a) Morphologisch wurden die Bakterien nach den üblichen Färbemethoden untersucht und nach BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology grob eingeordnet, da bekanntlich eine genaue Zuordnung isolierter Formen in den meisten Fällen unmöglich ist.

b) Zur Bestimmung der Restcellulose diente die Methode nach VILES u. a. (1949) mit 0,1%iger Anthronlösung als Farbreagens. Zur Bestimmung der bei der Gärung entstehenden organischen Säuren wurden Kulturen von 250 ml angelegt. Nach 24 stündiger Inkubationszeit wurde die Nährösung von der Bakterienmasse und Cellulose durch Zentrifugieren getrennt, mit verd. H_2SO_4 angesäuert und 24 Std lang mit Diäthyläther im KUTSCHER-STEUDEL-Extraktor extrahiert (nach PAECH u. TRACEY, 1955). Das vom Äther befreite Fettsäurekonzentrat wurde papierchromatographisch nach der Methode von REID u. a. (1951) untersucht. Zu quantitativen Messungen wurde diese Methode weiter ausgearbeitet (nach FISHER u. a., 1948). Als Grundlage diente eine mit einem genau eingestellten Säuregemisch aufgestellte Eichkurve; die Testlösungen wurden mit geeichten Capillaren aufgetragen. Es sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß diese Methode nur mit 10%iger Genauigkeit arbeitet. Sie reichte jedoch für die vorliegenden vergleichenden Untersuchungen aus.

¹ HUHTANEN benutzte allerdings statt 0,5% Cellulose 0,1% Glucose.

² Herrn Prof. Dr. R. MEYER danke ich für die freundliche Unterstützung bei den Isolierungen.

Die Zusammensetzung der Gärägase wurde nach dem Absorptionsverfahren bestimmt¹. Da CO₂ den größten Anteil stellte, wurden die sich während der Bebrütung entwickelnden Gase unter Quecksilber aufgefangen.

Untersuchungsergebnisse

a) Charakterisierung der Bakterien

Die mikroskopische Untersuchung der Pansenproben zeigte, daß die Fauna, die aus den verschiedensten Typen von Ciliaten besteht, sehr bald nach Entfernung aus ihrem natürlichen Milieu abstirbt. Ein mit Karbolfuchsin gefärbtes Totalpräparat des Panseninhalts wurde insbesondere auf die Bakterienflora untersucht. Morphologisch konnten etwa 34 verschiedene Typen, die sich zu 9 Gruppen zusammenfassen ließen, unterschieden werden:



Abb. 1. Totalpräparat von Schafpanseninhalt.

Phako Vergr.: 3500 ×

- 1). 5 Streptokokkentypen: \varnothing 0,5—2,0 μ ; mehrgliedrig, bis zu langen Ketten von 16 Individuen (8 Doppelzellen).
- 2). 6 Diplokokkentypen: \varnothing 0,8—1,5 μ .
- 3). 2 Streptokokkentypen, deren Einzelglieder sickel- oder S-förmig aneinandergelagert sind. \varnothing 1,0—1,5 μ .
- 4). 2 Sarcinatypen zu vier (oder ein Vielfaches davon) aneinandergelagert. \varnothing der Einzelglieder: 0,5—1,2 μ .
- 5). Ein Spirillentyp: $0,3 \times 10,0 \mu$ mit etwa 7 Windungen.
- 6). 3 Vibriotypen (teilweise nur leicht gekrümmt): $0,5 \times 1,5$; $0,5 \times 4,0$; $1,0 \times 4,0 \mu$.
- 7). 7 Typen von graden Stäbchen: $0,8—1,0 \times 1,4—7,0 \mu$.
- 8). 2 Typen von zigarrenförmigen Stäbchen: $0,8—1,0 \times 2,5—3,0 \mu$.
- 9). 1 Typ rosettenförmig angeordneter Stäbchen: $0,8—1,0 \times 2,5—3,0 \mu$.

Sporenbildner waren in ganz frischem Panseninhalt selten, bzw. es waren keine Zellen mit Endosporen zu erkennen. Nach 24 stündigem Verbleiben der Pansenprobe in Glucoselösung bei 37° C konnten zahlreiche Sporenmutterzellen beobachtet werden. Die isolierten Stämme waren im Gesamtpräparat nur sehr schwer wiederzuerkennen; die Bakterien erschienen in Kultur infolge des reichhaltigen Nahrungsangebotes insgesamt etwas größer. Der Schafpanseninhalt bot im wesentlichen das gleiche Bild wie der Rinderpanseninhalt. Auffallend war bei ersterem die große Zahl bohnenförmiger Organismen, die lebhafte Bewegungen ausführten und etwa in der Größenordnung von Hefezellen liegen; aber nur in einem einzigen Fall konnte ein Vorgang beobachtet werden, der an die Sprossung von Hefezellen erinnert. Diese Organismen ließen sich auf den üblichen Hefenährböden weder aerob noch anaerob züchten (Abb. 1).

Im Nährmedium nach HUHTANEN entwickelten sich unter den angewandten Bedingungen (also bei streng anaerober Züchtung) nur drei

¹ Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Analysen danke ich Herrn Inspektor AHRENS vom Städtischen Gaswerk Göttingen.

morphologisch verschiedene Arten von Bakterien sowohl aus Rinder- wie aus Schafpanse:

A. Ein kurzer, breiter, sporenloser Cellulosezersetzer $1,0 \times 3,0 - 6,0 \mu$ unbeweglich. 3 Rinderstämme und ein Schafstamm. — B. Ein schmaler, langer, beweglicher Sporenbildner, der nicht ausschließlich Cellulose zersetzt. $0,5 \times 5,0 - 10,0 \mu$. 3 Rinder- und 3 Schafstämme. — C. Ein *Streptococcus*, der gewöhnlich eine Kette von 4—8 Zellen bildet, keine Cellulose zersetzt, aber Milch- und Valeriansäure bildet. ♂: $1,0 \mu$. 4 Rinder- und 3 Schafstämme.

Die A-Stämme zeigten stumpfe, abgerundete Enden und wirkten im ganzen etwas gedrungener als die B-Stämme (Abb. 2). Die Sporenstadien



Abb. 2. Stamm R A1.
Phako Vergr.: 4000×



Abb. 3. Stamm R B1.
Phako Vergr.: 3750×



Abb. 4. Stamm R C1.
Phako Vergr.: 4000×

der B-Stämme waren im Phasenkontrastmikroskop auf den ersten Blick an den hell aufleuchtenden Endosporen zu erkennen. Das Aussehen der Sporenmutterzelle läßt darauf schließen, daß sie zur *Clostridium*-Gruppe gehören (Abb. 3). Wie Abb. 4 zeigt, waren bei den C-Stämmen (Streptokokken) Ketten von 6 Zellen häufig.

Rein makroskopisch konnten in Flüssigkeitskulturen die Sporenbildner von den Sporenlosen dadurch unterschieden werden, daß erstere schleimige Klumpen bildeten, die sich gegen Ende der Gärung absetzten, während die Sporenlosen die Lösung gleichmäßig trübten ebenso wie die Kokkenstämme, die jedoch erst später eine sichtbare Trübung entwickelten und kein Gas bildeten.

Die auf Vacuum-Agarplatten (nach GUTHOF, 1953) kultivierten Stämme zeigten im Profil die Form einer konvexen Linse. Während die Kokkenkolonien vollständig glatte Ränder hatten, sahen die Stäbchenkolonien auf den ersten Blick wie angehäufte Celluloseteilchen aus. Wie Abb. 5 zeigt, hatten diese Kolonien eine stark aufgerauhte Oberfläche und waren ringsum mit (nicht näher bestimmten) Teilchen bespickt.

Die aus Schafpanseninhalt auf dem gleichen Nährboden gezüchteten Stämme zeigten morphologisch — sowohl in Lösung als auch in Agar — keine Unterschiede; nur gelegentliche Krümmungen der A-Stämme konnten bei Schafstämmen häufiger beobachtet werden als bei Rinderstämmen.

Eine eindeutige Einordnung der isolierten Stämme ließ sich an Hand der hier angeführten Beobachtungen nicht durchführen. Man kann die Sporenlosen (kräftig cellulosezersetzenden Bakterien) auf Grund der Tatsache, daß sie zum Intestinaltrakt von Wirbeltieren gehören und ihrer Fähigkeit, organische Säuren und Gase zu bilden, zu der *Escherichia*-Gruppe stellen. Der Sporenbildner ist wohl eine spezifische cellulosezersetzende Art der *Clostridium*-Gruppe, wenn er auch morphologisch etwas



Abb. 5. Kolonieformen von Stamm *R A1*.
Hellfeld Vergr.: 375×

Abb. 6. Stamm *R A1* nach seiner
Veränderung. Phako
Vergr.: 4000×

abweicht. Die Streptokokken sind zu den *Lactobacteriaceae* zu zählen. Sie dürften als solche den in der Milch vorkommenden Kokken ähnlich sein.

In diesem Zusammenhang seien noch einige Beobachtungen erwähnt.

Die Kulturen wurden, um den Wachstumsverlauf zu verlangsamen, bei niedrigen Temperaturen gehalten ($4-5^{\circ}\text{C}$). Nach etwa 5 Monaten hatten sich zwei der *A*-Stämme morphologisch restlos verändert (Abb. 6). Die Stäbchen hatten sich zu kokkoiden Formen verkürzt und waren auch durch wiederholte Passagen auf den gewöhnlichen Nährböden nicht mehr zu regenerieren, d. h. sie zersetzen keine Cellulose mehr.

Das gleiche Ergebnis konnte auf völlig stickstofffreien Nährböden erzielt werden. Der Ansatz einer Massenkultur mit ruhenden Bakterienzellen, wie sie normalerweise zu Stoffwechseluntersuchungen Verwendung findet, war darum in diesem Falle nicht möglich. Das Fehlen der Gasentwicklung deutete schon makroskopisch darauf hin, daß keine normalen Zellen mehr vorhanden waren.

In einem weiteren Versuch über die Wirkung des Luftsauerstoffs wurden die Bakterien normal aerob bebrütet. Schon in der ersten Passage war kein normales Stäbchen mehr zu entdecken; sie hatten sich sämtlich

verkürzt (siehe oben: kokkoide Form). Auch nach Rückimpfung auf anaerobe Kulturen waren keine normalen Formen zu erreichen. Die beiden letzten Vorgänge ließen sich beliebig reproduzieren; in jedem Fall war die Veränderung irreversibel, selbst bei Anwendung eines Nahrungschocks durch Änderung der Substrate (z. B. Pansenflüssigkeit) oder deren Konzentration (Herabsetzung auf die Hälfte).

Niedrige Temperaturen, Sauerstoffzufuhr und Stickstoffmangel bewirken also gleiche morphologische und physiologische Veränderungen, nämlich Verkürzung der Stäbchen zu kokkoiden Formen und Verlust der Fähigkeit, Cellulose zu zersetzen. Da es sich zudem um Einzell-Isolierungen handelt, ferner um 3 verschiedene Stämme, wird die Annahme einer Verunreinigung höchst unwahrscheinlich¹.

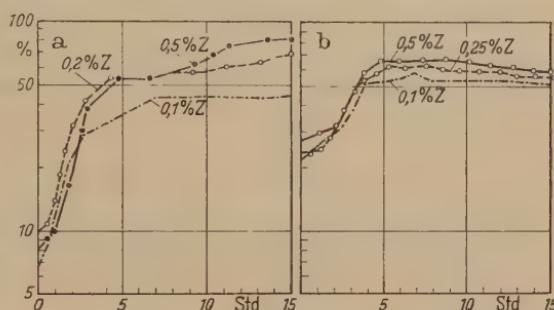


Abb. 7a. Einfluß des C-Gehaltes auf den Wachstumsverlauf von Stamm *R A1* bei gleichbleibendem N-Gehalt

Abb. 7b. Ebenso Stamm *S A1*. Ordinate logarithmisch

b) Ernährungsphysiologische Untersuchungen

1. Wachstumsteste

Kultivierungsversuche der Cellulosezersetzer (*A*-Gruppe) mit Pansenflüssigkeit als Nährsubstrat (Stickstoffquelle) hatten keinen Erfolg. Vereinzelt auftretende Trübungen waren so schwach, daß man daraus auf das Fehlen einer wichtigen Wachstumskomponente schließen kann. Auffallend viele der oben beschriebenen kokkoiden Formen, sowie einzelne Sporenbakterien entwickelten sich jedoch bei Pansenflüssigkeit als einziger Stickstoffquelle. Die oben beschriebene Nährlösung nach HUHTANEN (1952) wurde variiert, um das beste C/N-Verhältnis für die Kultur der Bakterien zu ermitteln.

Zunächst wurde der C-Gehalt der Nährlösung verändert: 0,5%; 0,25%; 0,1% Cellulose bei gleichbleibendem N-Gehalt. Abb. 7a und 7b zeigen, daß diese Veränderung sich praktisch weder auf Rinder noch auf Schafpansenbakterien auswirkt. Die N-Quelle wurde in der Weise verändert, daß von den vier obengenannten Komponenten je 1,0%; 0,5%; 0,25% bei gleichbleibendem Cellulosegehalt von 0,5% angesetzt wurden. Abb. 8a und 8b zeigen, daß — wie zu erwarten war — das Wachstum erheb-

¹ Die kokkoide Degenerationsform beobachtete ich nur als Diplokokken, niemals als längere Ketten wie die normalen Streptokokken, von denen sie sich auch physiologisch unterschieden. Ein genauerer Vergleich wurde nicht durchgeführt.

lich beeinflußt wird; ebenso aber auch die Gärintensität. Eine weitere Variierung bestand darin, daß dem Nährmedium einmal Trypton (tryptophanangereichert) und einmal Hefeextrakt (als Vitaminspender) fehlten (Abb. 9a und 9b). Die Tendenz der Wachstumskurven

(geringeres Wachstum bei Weglassen einer der Komponenten) ist bei Rinder- und Schafstämmen gleich; sie scheinen einen großen Bedarf an Vitaminen zu haben.

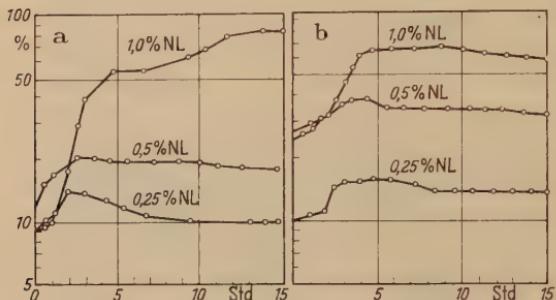


Abb. 8a. Einfluß des N-Gehaltes auf den Wachstumsverlauf von Stamm R.A.I. bei gleichbleibendem C-Gehalt

Abb. 8b. Ebenso Stamm S.A.I. Ordinate logarithmisch

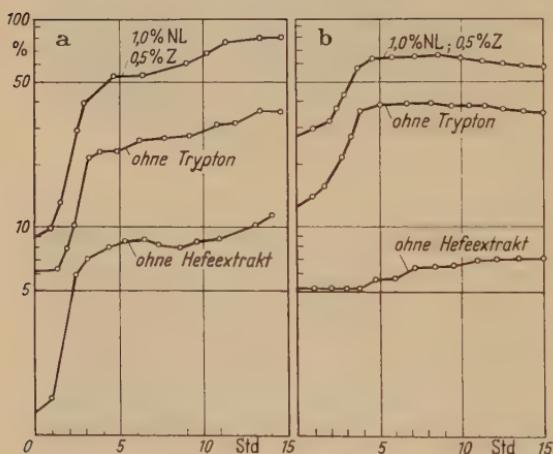


Abb. 9a. Wachstumsverlauf von Stamm R.A.I. bei Tryptophan- und Vitaminmangel

Abb. 9b. Ebenso Stamm S.A.I. Ordinate logarithmisch

biose haben etwa den gleichen Grad von Vergärbarkeit; Glucose wird am besten vergoren. Die B-Stämme des Rinderpansens sind in der Wahl der vergärbaren Kohlenhydrate unspezifischer als die A-Stämme. Die Streptokokken (C-Stämme) konnten keines der vorgelegten Kohlenhydrate vergären; wo gelegentlich schwache Gasentwicklung beobachtet wurde, handelte es sich nach mikroskopischer Überprüfung um eine Verunreinigung. Die Schafstämme zeigten im allgemeinen eine geringere

2. Verwertbare Kohlenhydrate

Eine weitere Untersuchungsreihe sollte zeigen, welche Kohlenhydrate außer Cellulose von den Bakterien ausgenutzt werden können und ob die nichtcellulosevergärenden Kokken in der Lage sind, andere C-Quellen zu verwerten. Für diese Übersichtsversuche genügte es, die CO₂-Bildung zu beobachten. Die Intensität der Gärung wurde an der Intensität der Gasentwicklung beurteilt (s. Tab. 1).

Aus ihr geht hervor, daß die A-Stämme des Rinderpansens von allen Stämmen die stärkste Gärintensität zeigen; lösliche Cellulose und Cello-

Gärintensität als die Rinderstämme. Stärke wird von einigen Stämmen, bei den Rinderstämmen hauptsächlich den *B*-Stämmen, vergoren, während Mannit hauptsächlich von den *A*-Stämmen angegriffen wird.

Tabelle 1. Verwertbare Kohlenhydrate

(+) schwache Gärung; + mittlere Gärung; ++ starke Gärung;
 +++ sehr starke Gärung; *A* sporenloser Stamm; *B* Sporenbildner;
C Streptococcus; *R* Rinderstamm; *S* Schafstamm

Stamm	Cellulose	lös. Cellul.	Cellobiose	Glucose	lös. Stärke	Mannit
<i>R A1</i>	+	++	+	++	—	(+)
<i>A2</i>	+	++	++	+++	(+)	+
<i>A3</i>	+	++	++	+++	+	+
<i>R B1</i>	+	+	+	+	+	—
<i>B2</i>	+	+	++	++	++	—
<i>B3</i>	++	++	++	++	—	++
<i>R C1</i>	—	—	—	—	—	—
<i>C2</i>	—	—	—	—	—	—
<i>C3</i>	—	—	—	—	—	—
<i>C4</i>	—	—	—	—	—	—
<i>S A1</i>	(+)	+	+	+++	++	+
<i>S B1</i>	(+)	+	(+)	+	—	—
<i>B2</i>	+	+	+	+	(+)	—
<i>B3</i>	+	+	+	++	—	+
<i>S C1</i>	—	—	—	—	—	—
<i>C2</i>	—	—	—	—	—	—
<i>C3</i>	—	—	—	—	—	—

c) Celluloseverbrauch und Gärprodukte

1. Celluloseverbrauch

Der Celluloseverbrauch innerhalb einer 24 stündigen Inkubationszeit wurde von je einem Rinderstamm der *A*-, *B*- und *C*-Gruppe jeweils in drei Ausführungen bestimmt. Der Wert von 1,0% des *C*-Stammes liegt offenbar innerhalb der Fehlgrenze und kann nicht als wirklicher Celluloseverbrauch gewertet werden. Innerhalb von drei Monaten sank der Celluloseverbrauch des *R A1*-Stammes von 21,3% auf 5,8%; ebenso ließ die Gasentwicklung merklich nach.

2. Organische Säuren als Endprodukte

Die Inkubationszeit wurde für alle Kulturen, die miteinander verglichen werden sollten, auf 24 Std festgelegt, zu welchem Zeitpunkt die Gärung mit Sicherheit beendet ist. Von den cellulosezersetzenden Stammgruppen des Rinder- und Schafpansens wurde jeweils ein Stamm

mit vier verschiedenen Kulturmedien auf seine Säurebildung untersucht, und zwar mit Cellulose, löslicher Cellulose, Stärke und Nährmedium

Tabelle 2. Celluloseverbrauch nach 24 stündiger Kulturdauer

Stamm	Extinktion	Restmenge mg	Verlust in %	% Mittel
R A1	0,600	39,0	22,0	21,3
	0,595	38,0	24,0	
	0,630	41,0	18,0	
R B1	0,710	44,0	12,0	12,3
	0,730	45,0	10,0	
	0,680	42,5	15,0	
R C1	0,830	50,0	0,0	1,0
	0,810	49,0	2,0	
	0,820	49,5	1,0	

Tabelle 3. Zusammensetzung der Säureextrakte (in Prozent der Gesamtsäure)

R Rinderstamm; S Schafstamm; A sporenlose Stämme; B Sporenbildner; C Streptokokken; Z Cellulosesuspension; LZ lösliche Cellulose; St lösliche Stärke; O ohne Kohlenhydrat

Bakt.-stamm	Milchsäure	Essigsäure	Propionsäure	Buttersäure	i-Valer.-säure	n-Valer.-säure	Gesamt-säure in mM	
R A2 Z	33,5	37,8	4,2	6,7	10,7	6,5	15,51	
	LZ	35,0	34,0	5,0	8,5	10,5	16,88	
	St	46,0	45,5	Spur	—	8,5	9,92	
	O	54,0	46,0	Spur	—	Spur	7,80	
R B2 Z	34,5	39,5	3,0	15,0	3,5	4,5	8,23	
	LZ	34,0	40,0	3,5	14,5	4,5	9,90	
	St	28,5	39,0	5,5	10,5	7,0	6,92	
	O	39,0	32,0	7,0	Spur	13,0	9,0	
R A1 Z	46,5	34,0	3,5	6,0	5,5	4,5	5,43	
	A3 Z	45,0	35,0	4,0	6,5	5,0	6,18	
	B1 Z	55,0	18,5	4,0	9,5	6,5	6,09	
	B3 Z	39,5	23,5	6,0	14,5	8,0	7,61	
R C3 Z	57,0	—	—	—	10,0	33,0	2,65	
	S C1 Z	61,0	—	—	—	8,0	31,0	2,47
	S B1 Z	28,5	17,5	4,5	23,5	10,0	18,0	4,48
	S B3 Z	36,5	35,0	3,5	13,0	5,0	7,0	14,73
S A1 Z	28,5	27,5	3,5	12,5	12,5	14,5	4,17	
	LZ	30,5	23,0	5,0	15,5	9,0	17,0	6,15
	St	28,0	13,0	8,0	15,0	12,5	23,5	6,45
	O	24,0	32,5	—	—	21,0	23,5	5,42
S B2 Z	21,5	15,5	5,5	30,0	14,5	13,0	7,21	
	LZ	20,0	17,0	5,5	21,0	15,0	20,5	8,72
	St	31,0	14,5	6,0	7,5	17,0	24,0	5,39
	O	33,0	14,0	Spur	—	17,5	35,5	7,64

ohne besonderes Kohlenhydrat. Sämtliche anderen Stämme einschließlich der Kokken wurden nur mit Cellulose geprüft (vgl. Tab. 3).

Aus Tab. 3 wird ersichtlich, daß die Rinderstämme der *A*-Gruppe, insbesondere *R A2*, bei Cellulose als einziger C-Quelle — abgesehen von den *C*-haltigen N-Verbindungen — weitaus die größten Säuremengen bilden. Die Sporenstämme (*RB* und *SB*) bilden in allen vier Lösungen etwa gleiche Mengen. Die Kokken (*RC* und *SC*) bilden die geringsten Säuremengen, und zwar lediglich Milch- und Valeriansäuren, wobei von letzteren die n-Säure überwiegt. Die Bildung erfolgt hier offenbar nur aus den *C*-haltigen N-Verbindungen.

Schafstämme bilden in den Medien allgemein weniger Säuren; auffallend ist die hohe Konzentration an Valeriansäure und die geringen Milch- und Essigsäuremengen.

Tabelle 4

Stamm	Essigsäure/ Buttersäure	Buttersäure/ Propionsäure	Stamm	Essigsäure/ Buttersäure	Buttersäure/ Propionsäure
<i>A-Stämme</i>					
<i>R A1 Z</i>	5,32	1,70	<i>R B1 Z</i>	1,93	2,36
<i>A2 Z</i>	5,27	1,65	<i>B2 Z</i>	2,65	2,32
<i>A3 Z</i>	5,30	1,63	<i>B3 Z</i>	1,62	2,40
<i>R A2 LZ</i>	4,07	1,70	<i>B2 LZ</i>	2,73	4,22
<i>S A1 Z</i>	2,20	2,50	<i>B2 St</i>	3,67	1,93
<i>A2 LZ</i>	1,47	3,15	<i>S B1 Z</i>	0,74	5,25
			<i>B2 Z</i>	0,52	5,45
			<i>B3 Z</i>	2,68	3,70
			<i>B2 LZ</i>	0,81	3,80
			<i>B2 St</i>	1,94	1,25

Einige Verhältniszahlen sollen das Bild etwas verdeutlichen (Tab. 4): Das Verhältnis ist bei allen *A*-Stämmen nahezu konstant; nur bei löslicher Cellulose ist das Verhältnis etwas zugunsten der Buttersäure verschoben, sowohl bei Rinder- wie bei Schafpansenstämmen. Essigsäure wird am meisten gebildet; dann folgen Buttersäure und Propionsäure. Diese Reihenfolge wird von Rinder- und Schafstämmen gleicherweise eingehalten. Bei Sporenbildnern (*B*-Gruppe) ist die Konstanz der Verhältnisse nicht so evident wie bei den *A*-Stämmen; der Vergleich mit dem Verhältnis in Stärke-Nährlösung beweist wiederum, daß die Sporenbildner unspezifischer in bezug auf die Verwertung der C-Quellen sind.

Trotz den unterschiedlichen Gesamtsäuremengen blieben die Anteile der einzelnen Säuren innerhalb einer Stammgruppe ziemlich konstant. Das gilt besonders für die Säuren, die als Endprodukte des Cellulosestoffwechsels hauptsächlich in Frage kommen. Bei Stamm *R A2* ist

gegenüber den anderen *A*-Stämmen ein relativer und absoluter Anstieg der Valeriansäure-Konzentration festzustellen. Bei den Schafstämmen stellt die Valeriansäure sogar teilweise den höchsten Anteil an der Gesamtsäure.

Die Verhältnisse in Cellulosesuspension und löslicher Cellulose sind praktisch gleich. Stärke wird von Rinder- und Schafstämmen verschieden ausgenutzt. Beim *S*-Stamm weicht die Säurebildung nicht wesentlich von der in Cellulose ab. In der Nährlösung ohne besonderes Kohlenhydrat bildet der *R*-Stamm nur Milch- und Essigsäure, der *S*-Stamm außerdem — fast zu gleichen Teilen — Iso- und n-Valeriansäure und Spuren von Capronsäure. (Alle Schafstämmen bildeten Spuren von Capronsäure, die allerdings quantitativ nicht zu erfassen waren.)

Laut Tab. 3 wirkt Cellulose auf die Bildung von Propion-, Butter- und Valeriansäure ein, ebenso wie auf Milch und Essigsäure, die jedoch prozentual (im Vergleich zu Kulturen ohne Cellulose) zurückgehen. Umgekehrt scheinen diese Säuren, besonders Valerian- und Buttersäure, ihrerseits einen Einfluß auf die Cellulosezersetzung auszuüben, so daß eine Erhöhung der Gesamtsäuremenge resultiert (vgl. Tab. 6).

3. Gasförmige Endprodukte

Die bei der Gärung entstehenden Gase wurden in einer gärenden Kultur (Stamm *R A1*) auf dem Höhepunkt der Gärung untersucht, um einen guten Durchschnitt zu erhalten. Den größten Anteil stellt CO_2 , dann folgt H_2 ; der Rest besteht, wie qualitativ festgestellt wurde, aus H_2S und NH_3 . Der Prozentsatz von H_2S liegt vermutlich unter 5%. Methan wird nicht gebildet; der Anteil des CO_2 dürfte hauptsächlich aus der Neutralisierungsreaktion des Bicarbonats stammen, mehr als aus dem eigentlichen Gärprozeß (Tab. 5).

Tabelle 5

Gas	Vol-%
CO_2	56
H_2	33
CH_4	—
Rest	11

Tabelle 6

Substrat	Celluloseverbrauch
N. L. ohne Säurezusatz	21,3%
N. L. + n-Valeriansäure	35,5%
N. L. + n-Capronsäure	34,5%
N. L. + i-Buttersäure	64,0%
N. L. + Milchsäure	32,0%

4. Faktoren, die den Celluloseabbau beeinflussen

Die bei der Gärung der *R A*-Stämme entstandenen Säuren wurden auf Grund der oben angeführten Beobachtungen auf einen möglichen Einfluß auf den Celluloseabbau hin untersucht. Jede Säure wurde in einer Konzentration von 0,01% vor der Beimpfung einer Nährlösung zugesetzt. Essig- und Propionsäure waren inaktiv; alle anderen getesteten Säuren wirkten fördernd auf die Cellulosezersetzung ein (Tab. 6).

Besprechung der Ergebnisse

Zur Methodik

Alle Autoren, die sich mit dem Problem der Pansenbakterien befaßten, stellten übereinstimmend fest, daß die Kultivierung der Organismen große Schwierigkeiten bereitet. HUHTANEN (1952) hat auf Grund eingehender Untersuchungen des Pansenmilieus am lebenden Tier versucht, die hier vorherrschenden Bedingungen auf das Kulturmedium *in vitro* zu übertragen. Der Pansen ist ja nicht eigentlich ein Verdauungsorgan und besitzt als solches auch kein Enzymsystem. Er hat nur die Funktion einer Gärkammer, in der eine intensive Gärtätigkeit der Mikroorganismen stattfindet. Die Art der Umsetzungen läßt auf streng anaerobe Verhältnisse schließen. Diese Annahme ließ sich durch HUHTANEN, der im Pansen ein Redoxpotential von — 300 mV messen konnte, bestätigen. Für mikrobielle Cellulosezersetzung im Pansen scheinen diese Bedingungen also Voraussetzung zu sein. Das entspricht auch den für die Kultur *in vitro* notwendigen Bedingungen.

Eine zweite wichtige Funktion, die der Pansen im Hinblick auf seine Bewohner erfüllt, ist die Aufrechterhaltung des Neutralbereiches. Der pH-Bereich von 6,6—7,6 wird durch ständigen Speichelzufluß (reich an NaHCO_3) konstant gehalten. Der hohe CO_2 -Gehalt der Pansen-Atmosphäre stellt mit dem Bicarbonat des Speichels ein ideales Puffersystem dar. Eine zweite Möglichkeit der Pufferung liegt in der Neutralisierung der organischen Säuren durch das aus der Eiweißzerersetzung stammende NH_3 .

Die Zusammensetzung der Pansenflora ist weitgehend von der dem Wirtstier gebotenen organischen Nahrung abhängig. Allgemein scheint die Tatsache festzustehen, daß eiweißreiche Nahrung sich günstig auf die Entwicklung der Kokken auswirkt, während cellulosereiche Nahrung, z. B. Heu, die Entwicklung von Bakterien begünstigt.

Eines der schwierigsten Probleme war im Laufe der vorliegenden Untersuchungen die Herstellung streng anaerober Verhältnisse. Das langsame Anwachsen der isolierten Stämme machte es erforderlich, von Anfang an gleichmäßig anaerobe Bedingungen zu schaffen. Die Einführung reduzierender Agentien bedeutete darum für dieses spezielle Arbeitsgebiet einen großen Fortschritt. Im Überschuß zugesetzt, gewährleisten sie auch bei aerober Kultivierung ein stets gleichmäßig niedriges Redoxpotential. Zur längeren Aufbewahrung der Kulturen hat sich jedoch ein zusätzlicher Verschluß mit paraffingetränkten Wattestopfen bewährt. Die Gewinnung von Panseninhaltsproben zur Beimpfung von Nährösungen muß ebenfalls unter diesem Gesichtswinkel gesehen werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen war es nicht möglich, mit einem Tier mit Fistel zu arbeiten. Das hätte die Kultivierung sicherlich sehr erleichtert; denn auch in der Literatur wird dieser Methode vor allen anderen der Vorzug gegeben. Man kann aber

auch durch schnelles und sauberes Ausheben des Pansens zum Ziele kommen, wenn man dafür sorgt, daß der Weg, den die Probe bis zum Aufnahmesubstrat nimmt, weitgehend sauerstofffrei ist.

Für die Erhaltung des Neutralbereiches ist ein Phosphatpuffer kombiniert mit einem Bicarbonat-CO₂-System die beste Lösung. Sie hat bei den vorliegenden Untersuchungen den pH-Wert nach Beendigung der Gärung im Höchstfalle auf 6,6 absinken lassen. Bei der Probenentnahme aus einem Schlachttier ist zu beachten, daß dies unmittelbar nach dem Tode erfolgt, bevor eine Säuerung des Panseninhalts durch Nachgärung einsetzt und die Bakterienflora abtötet. Auch in dem Übertragungsmedium (in diesem Falle Glucoselösung) dürfen die Organismen nicht allzu lange gehalten werden, da auch hier die Gefahr der Säuerung der begrenzende Faktor ist.

Um den Pansenorganismen adäquate Lebensbedingungen zu schaffen, lag es nahe, zunächst ihr natürliches Substrat, nämlich Pansenflüssigkeit, heranzuziehen. HUNGATE, HALL, HEALD und andere setzten einem definierten Mineralmedium einen bestimmten Prozentsatz Pansenflüssigkeit zu. Nach den eigenen Erfahrungen resultierte aus Pansenflüssigkeitskulturen nur äußerst schwaches Wachstum, erst recht keine Gärung. Selbst bei Zusatz von vitaminfreiem Caseinhydrolysat und Tryptophan waren diese Mängel nicht zu beheben. Der Mißerfolg kann nur durch den geringen Gehalt an eiweißhaltigen Substanzen erklärt werden; denn auch Zusatz von Vitaminen (Hefeextrakt) führte zu keinem Erfolg. Wahrscheinlich sind die Pansenbakterien an das feste Substrat (Futter) gebunden. HUHTANEN hat dieser Tatsache offensichtlich bei der Entwicklung seiner Kulturmethode Rechnung getragen und seinem Medium die im Substrat des Pansens deponierten Eiweiße in anderer Form zugesetzt. Der Gehalt der Nährlösung an organisch gebundenem Stickstoff erscheint auf den ersten Blick natürlich sehr hoch gegenüber dem relativ niedrigen Gehalt an Kohlenstoff, ist jedoch für die künstliche Kultivierung der hier isolierten Pansenbakterien optimal (vgl. Ausführungen über die Wachstumsteste).

Zusammenfassend soll zur Methodik nur so viel gesagt werden, daß ihre Schwierigkeiten äußerste Vorsicht in bezug auf die Interpretation der Untersuchungsergebnisse gebieten.

Zu den Untersuchungsergebnissen

Alle Kulturen, die mit den oben erörterten Methoden angelegt wurden, zeigten immer wieder die gleichen morphologischen Typen, obwohl der Panseninhalt in bezug auf seine Bewohner sehr mannigfaltig war (oder wenigstens erschien). Das Nährmedium nach HUHTANEN scheint selektiv zu wirken, aber nicht — wie vielleicht zu erwarten gewesen wäre — in Richtung der Cellulosezersetzer (denn auch Kokken, die keine Cellulose zersetzen, kamen in ihm zur Entwicklung), sondern offensichtlich mehr in Richtung der Organismen, die ein sehr niedriges C/N-Ver-

hältnis haben. Ob die Nahrung der einzige auswählende Faktor ist oder auch andere Komponenten, wäre zu erörtern.

Unter den oben beschriebenen isolierten Typen konnten die Streptokokken keine Cellulose zersetzen, zumindest unter den hier angewandten Bedingungen nicht. HUNGATE (1950) war es gelungen, Reinkulturen von „faserspaltenden“ Kokken (er benutzte keine reine Cellulose, sondern Luzernemehl als C-Quelle) zu erhalten, ebenso SIJPESTEIJN (1951) und HUHTANEN (1953). Letzterer betont jedoch, daß es sehr schwierig ist, Kokkenreinkulturen zu erhalten, weil sie oft in Symbiose mit anderen Bakterien leben. Die hier isolierten Kulturen stammten alle aus Einzell-Kulturen und müßten demzufolge die Gewähr für absolute Reinheit bieten. Sie bildeten Milch- und Valeriansäure, aber kein Gas. Gasentwicklung und Celluloseverbrauch waren stets untrügliche Zeichen dafür, daß die Kokkenkultur nicht rein war. Auch mikroskopisch konnte das in jedem Fall bestätigt werden. Wenn es sich hier nur um cellulosespaltende aber nicht gärende Organismen handelte, so hätte sich das zumindest durch merklichen Celluloseverbrauch dokumentieren müssen. Bei den obengenannten Autoren finden sich leider keine quantitativen Angaben über die cellulosespaltende Fähigkeit ihrer Kokkenstämme. Die Frage der „faserspaltenden Pansenkokken“ ist noch sehr problematisch und nicht eindeutig ohne weitere eingehende Untersuchungen zu erklären. Morphologisch ähneln die hier isolierten Kokken den gelben Kokken HUNGATES oder den RO-LCC- oder RO-SCC-Typen HUHTANENS. Da sie bei eiweißreichem Futter an Zahl im Pansen zunehmen, wäre an eine andere Funktion innerhalb der Pansenflora zu denken. Die eigentlichen aktiven Cellulosezersetzer des Pansens scheinen also die stäbchenförmigen Mikroorganismen zu sein. Nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen sind Nichtsporenbildner dabei die aktivsten. (HUNGATE, 1950; HALL, 1952; HUHTANEN, 1953). Nur HUNGATE (1944) berichtet von einem Sporenbildner „*Clostridium cellobioparum*“, der ebenfalls Cellulose zerstetzt.

Der gezüchtete Sporenbildner, ein unspezifischer Cellulosezersetzer, der auch Stärke ausnutzen kann, scheint ein mit der Nahrung aufgenommener vorübergehender Passant zu sein. Der A-Stamm dagegen als spezifischer Cellulosezersetzer soll im Sinne von APPLEBY (1955), der die Bezeichnung „true rumen bacteria“ von den äußeren Faktoren Anaerobiose, Temperatur (37°) und Bicarbonatpuffer abhängig mache, deshalb als „panseneigen“ bezeichnet werden, weil er sich bei Fehlen dieser Faktoren anormal verhielt. HUHTANEN (1953) deutete zwar auch an, daß sich seine Stäbchen in alternden Kulturen zu einer Art kokkoiden Form verändern, aber über morphologische Veränderungen infolge von Aerobiose ist bisher noch nicht berichtet worden. Die veränderten Organismen leben und vermehren sich zwar weiter, aber sie besitzen nicht mehr die Eigenschaften der normalen Zellen. Bemerkenswert ist,

daß diese spontane Veränderung reproduzierbar war und stets gleichartig verlief, so daß eine Verunreinigung ziemlich sicher ausgeschlossen werden kann. Da die Veränderung irreversibel war, wird eine einmalige völlige Umstimmung der Bakterien angenommen. Welcher Anteil der gesamten Mikrobenwelt des Pansens auf die eigentlich „panseneigene“ entfällt, ist schwer zu sagen, solange ihre Kultivierung auf künstlichen Nährböden solche Schwierigkeiten bereitet. Im weiteren Sinne muß zur panseneigenen Mikrobenwelt auch die Fauna — speziell die Ciliaten — gerechnet werden; denn auch sie sind an die Bedingungen des Pansenmilieus angepaßt. WESTPHAL (1937) konnte nachweisen, daß die Ciliaten des Pansens sehr empfindlich auf Sauerstoff reagieren. An der Cellulosezersetzung scheinen sie nicht unmittelbar beteiligt zu sein.

Die Hauptendprodukte der Cellulosezersetzung sind nach unzähligen Befunden in Essig- und Buttersäure zu sehen. Die hier untersuchten Stämme bildeten allerdings eine ganze Reihe von Säuren, die nicht alle als Endprodukte des Cellulosestoffwechsels anzusehen sind¹. Da die Organismen nicht in ruhender Kultur untersucht werden konnten, die reichhaltige Stickstoffquelle also unentbehrlich war, wurden Kulturen mit und ohne Cellulose in ihren Endprodukten miteinander verglichen. Ohne besondere C-Quelle als Cellulose, sonstiges Polysaccharid oder Zucker wurde in keinem Falle Buttersäure gebildet, alle anderen Säuren in weit geringerem Maße. Das Medium ist zu komplex, um Aussagen darüber machen zu können, wie sich die Endprodukte auf die einzelnen Nährstoffquellen verteilen. Bemerkenswert ist jedoch, daß die Reinkulturen derart heterofermentativ sind; nur die Kokken scheinen eine bestimmte Art ihrer Energiegewinnung zu bevorzugen.

Weiterhin ist zu beachten, daß die Schafpansenbakterien bedeutend mehr Valeriansäure bilden als die Rinderpansenstämme, teilweise sogar in einer im Verhältnis zur Gesamtäure sehr großen Menge. Diese Beobachtung haben schon frühere Autoren, die Schafpansenbakterien untersucht haben, gemacht. Es ist anzunehmen, daß die Valeriansäure hauptsächlich aus der Desaminierung von Aminosäuren stammt. Da sie nach den vorliegenden Untersuchungen einen fördernden Einfluß auf die Cellulosezersetzung ausübt (neben Capron- und Isobuttersäure), so ist verständlich, warum sich das Fehlen von organisch gebundenem Stickstoff so nachteilig auswirkte. Keiner der Stämme entwickelte während der Gärung Methan. Das Ergebnis stimmt mit dem von R. MEYER (1938) überein, der bei Reinkulturen von Cellulosezersetzern kein Methan und

¹ BAUMANN u. FOSTER (1955) untersuchten Stäbchenstämme aus Tieren mit Heudiät (Luzerneheu), die keine Cellulose, aber Stärke und einige einfache Zucker unter Bildung von Essigsäure und Milchsäure im Verhältnis 2 : 1 zersetzen. Aus Tieren mit konzentrierter Nahrung (Gras) isolierten sie Kokken, die aus Glucose Milchsäure und Essigsäure im Verhältnis 10 : 1 bildeten.

bei den einzelnen Stämmen unterschiedliche Mengen von CO_2 , H_2 und N_2 fand. NH_3 und H_2S , das Stamm *RA 1* bildet, stammt mit Sicherheit aus Eiweiß bzw. Cystein-HCl. Da im Pansen durchschnittlich 4% Methan gefunden werden, ist anzunehmen, daß es sich um besonders geartete Bakterien handeln muß, die die Fähigkeit zur Methanbildung haben, aber nicht zur cellulosezersetzenden Flora des Pansens gehören. BEIJER (1952) fand bei Untersuchungen am lebenden Tier, daß niedere Fettsäuren für Methanbakterien (*Sarcina*) ein gutes Substrat bilden. Er erklärt die Abwesenheit von H_2 im Pansen damit, daß die Methanbakterien H_2 sofort zur Bildung von CH_4 benutzen.

In diesem Zusammenhang soll noch kurz auf eine Beobachtung eingegangen werden: Wenn man den Gasraum über der Nährösung vor der Bebrütung durch CO_2 ersetzt, so kann man am Steigen des Quecksilbers im Capillarrohr feststellen, daß während der ersten halben Stunde der Bebrütung von den Bakterien CO_2 verbraucht wird. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von HUHTANEN überein, der mit C^{14}O_2 aus Soda feststellte, daß die Bakterien dieses CO_2 in Fettsäuren und Bakterienplasma einbauten.

Nach dem heutigen Stand der Pansenforschung ist eine Darstellung von Stoffwechselvorgängen in diesem Organ noch nicht zum kleinsten Teil möglich. Man muß im Pansen nicht nur mit Symbiosen zwischen Wirtstier und Bakterien, sondern auch zwischen Bakterien untereinander rechnen. Diese Tatsache ist an sich selbstverständlich; man müßte sie aber bei allen Erörterungen über dieses Problem mehr in Betracht ziehen. Untersuchungen mit Panseninhaltsproben geben zwar einen Überblick über den gesamten Stoffwechsel im Pansen, lassen aber keine Schlüsse über die Funktion einzelner Organismen oder das Zusammenwirken mehrerer zu. Außerdem wäre es wünschenswert, durch weitere Untersuchungen mehr Kenntnisse über die Beziehungen der Flora zur Fauna des Pansens zu bekommen.

Der Wiederkäuer als pflanzenfressendes Tier ist — da er keine cellulose-spaltenden Fermente besitzt — auf die Tätigkeit der cellulosezersetzenden Bakterien angewiesen, um an die in der Pflanzenzelle eingeschlossenen Nährstoffe heranzukommen. Die von den Bakterien gebildeten Spaltprodukte der Cellulose können vom Pansenepithel adsorbiert und weiter zu körpereigenen Substanzen umgebaut werden (PENNINGTON, 1954). Die Bedeutung der Pansenbakterien ist also im Hinblick auf das Wirtstier recht erheblich, besonders, wenn man auch die proteolytischen Bakterien mit berücksichtigt.

Zusammenfassung

Drei verschiedene Bakterientypen (10 Rinder- und 7 Schafstämmen) wurden mit dem Mikromanipulator isoliert: ein sporenloser, unbeweglicher, aktiver Cellulosezersetzer, ein beweglicher, sporenbildender, unspezifischer Cellulosezersetzer und eine Gruppe von nicht cellulosezersetzenden Streptokokken.

Faktoren, die an dem aktiven Cellulosezersetzer morphologische Veränderungen bei gleichzeitigem Verlust der Fähigkeit zur Cellulosespaltung auslösen, wurden ermittelt.

Nährmedium mit unterschiedlichen C/N-Verhältnissen sowie Trypton- und Vitaminmangel wurden an Hand von Wachstumstesten auf ihre Eignung für Pansenbakterien geprüft. Das Medium nach HUHTANEN mit 0,5% Cellulose als C-Quelle und insgesamt 4% N-Quelle gewährte optimales Wachstum und optimale Gärung. Pansensubstrat erwies sich in allen Fällen als Nährsubstrat ungeeignet.

Mit sämtlichen Stämmen wurden insgesamt sechs verschiedene Kohlenhydrate auf ihre Vergärbarkeit geprüft. Cellulose wurde von den cellulosezersetzenden Nicht-Sporenbildnern am besten, den Sporenbildnern in geringerem Umfang und den Kokken gar nicht ausgenutzt.

Als Endprodukte der Cellulosezersetzung wurden folgende Säuren bestimmt: Essigsäure, Propionsäure, i-Buttersäure, i-Valeriansäure, n-Valeriansäure und Milchsäure, bei den Schafstämmen auch Spuren von Capronsäure. Die Verhältnisse Essigsäure/Buttersäure und Buttersäure/Propionsäure zeigen bei den aktiven Cellulosezersetzern eine evidente Konstanz.

Ein cellulosezersetzender Rinder-Stamm wurde auf gasförmige Endprodukte untersucht und der prozentuale Anteil an CO_2 , H_2 und eines Restes (NH_3 und H_2S) bestimmt.

Der Celluloseabbau wurde gefördert durch i-Buttersäure, n-Valeriansäure, n-Capronsäure und Milchsäure. Essigsäure und Propionsäure waren inaktiv.

Herr Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES danke ich für die Anregung dieser Arbeit und das ihr entgegengebrachte Interesse. Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- APPLEBY, J. Chr.: J. Gen. Microbiol. **12**, 526 (1955). — BAUMANN, H. E., u. a.: J. Bacter. **71**, 333 (1955). — BELIER, W. H.: Nature (Lond.) **170**, 576 (1952).
- BERGEY, O. H.: Manual of Determinative Bacteriology. London 1948. — DOFLEIN, F., u. E. REICHENOW: Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena: G. Fischer 1953. — FISHER, R. B., u. a.: Nature (Lond.) **161**, 764 (1948). — GUTHOF, O.: Zbl. Bakter. I Orig. **161**, 298 (1953). — HALL, E. R.: J. Gen. Microbiol. **7**, 350 (1952). — HEALD, P. J., u. a.: J. Gen. Microbiol. **9**, 207 (1953). — HUHTANEN, C. N., u. a.: J. Bacter. **64**, 17 (1952). — HUHTANEN, C. N., u. a.: J. Bacter. **65**, 548, 554 (1953). — HUHTANEN, C. N., u. a.: J. Bacter. **68**, 749 (1954). — HUNGATE, R. E.: J. Bacter. **48**, 499 (1944). — HUNGATE, R. E.: J. Bacter. **53**, 631 (1947). — HUNGATE, R. E.: Bacter. Rev. **14**, 1 (1950). — MEYER, R.: Arch. Microbiol. **9**, 80 (1938). — PAECH, K., u. M. V. TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse II, 482. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — PENNINGTON, R. J.: Biochemie. J. **56**, 410 (1954). — REID, R. L., u. a.: Biochemic. J. **50**, 60 (1951). — SIJPESTEIJN, A. K.: J. Gen. Microbiol. **5**, 869 (1951). — SIJPESTEIJN, A. K., u. a.: Biochemic. J. **52**, 41 (1952). — VILES, F. L., u. L. SILVERMANN: Anal. Chem. **21**, 950 (1949). — WESTPHAL, A.: Z. Parasitenkunde **7**, 71 (1934).

(Aus der Bayer. Biologischen Versuchsanstalt München)

Eine neuere Beobachtung über Antibiose bei Pseudomonas-Bakterien*

Von
GERTRUD BRUNNER

(Eingegangen am 13. August 1956)

In der Geschichte der Antibiose und Entwicklung der Antibiotica spielen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* eine bedeutsame Rolle. Schon 1887 berichtete GARRE, daß *Pseudomonas putida* das Wachstum von Staphylokokken, Typhusbakterien und FRIEDLÄNDERSchen Pneumoniebakterien hemmt, und OLITZKY zeigte¹, daß *Pseudomonas fluorescens* eine entwicklungshemmende Wirkung auf Staphylokokken, Typhusbakterien, Milzbrandbacillen und Choleravibrionen ausübt. Zwei Jahre später (1889) beobachteten FREUDENREICH und unabhängig von ihm BOUCHARD Hemmung des Wachstums von Typhusbakterien und Choleravibrionen durch *Pseudomonas pyocyanea* (*Ps. aeruginosa*). 1899 gelang es EMMERICH u. Löw, Konzentrate der aktiven Substanz dieses Mikroorganismus herzustellen, in der sie ein bakteriolytisches Enzym vermuteten. Den antibiotisch wirksamen Stoff nannten sie Pyocyanase. Die Pyocyanase ist das erste echte Antibioticum, das als solches erfaßt wurde und auch in der Therapie erfolgreich Verwendung fand. 1930—33 konnten GUNDEL u. WAGNER sowie HETTCHE nachweisen, daß es sich bei der Pyocyanase um eine fettsäureartige Substanz handelt. In dieselbe Zeit fällt die Isolierung des Farbstoffs Pyocyanin als zweiten antibiotischen Stoffes aus *Ps. pyocyanea*, und ebenfalls etwa gleichzeitig erkannte man die Hemmwirkung des Farbstoffes Chlororaphin aus *Ps. chlorraphis*.

Im Sommer 1952 hatten meine Mitarbeiterin RUTH STRIEGEL und ich selbst Gelegenheit, eine Antibiose bei *Pseudomonas*-Bakterien zu beobachten. Anlässlich eines ausgedehnten Karpfensterbens durch infektiöse Bauchwassersucht in natürlichen, nicht ablaßbaren Teichen eines bis dahin von der Seuche verschonten Gebietes wurde von einem verendeten Fisch an Ort und Stelle eine Probe für die bakteriologische Untersuchung entnommen. (Da lebende kranke Karpfen nicht zu erhalten waren, mußten wir von unserem Grundsatz, nur lebende oder frisch getötete Fische bakteriologisch zu untersuchen, notgedrungen abweichen.) Die Probe bestand aus dem wäßrigen Inhalt einer mit Flüssigkeit gefüllten großen Blase unter der Haut des Karpfens, von der noch am selben Tag Ausstrichkulturen auf Nähragarplatten angelegt wurden. Diese zeigten nach 48 stündiger Bebrütung bei 22°C reichliches Bakterienwachstum von runden, glatten, glänzenden, beigefarbenen Kolonien. Nach der ersten mikroskopischen und kulturellen Untersuchung schien eine Reinkultur

* Herrn Prof. Dr. K. v. FRISCH zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹ Die folgenden Angaben sind H. VOGEL „Die Antibiotica“ entnommen.

von *Ps. punctata* vorzuliegen, die als häufiger Krankheitserreger bei der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens bekannt ist. Erst nach längerer Zeit machten wir die Feststellung, daß wir es mit einer Mischkultur zu tun hatten, weil auf einigen Schrägagarröhrenchen des vermeintlich reinen *Punctata*-Stammes Fluorescenz auftrat. Eine neuerrliche Überprüfung dieser Kulturen ergab das Vorherrschen eines ebenfalls bei infektiöser Bauchwassersucht oftmals anzutreffenden fischpathogenen Fluorescenten, der *Ps. punctata* fast völlig verdrängt hatte. Dies war ihm vermutlich dadurch erleichtert worden, daß wir nach dem Beimpfen des Schrägagarröhrcchens das Quetschwasser über den Ausstrich hatten laufen lassen.

Bei Angehörigen der gleichen Bakterienart, die wir als „*Bacterium München*“ oder „*Ps. granulata*“ bezeichneten, hatten wir früher schon wiederholt die Beobachtung gemacht, daß fluoreszierende Stämme nach Verimpfung in lebende Karpfen ihr Fluorescinbildungsvermögen durch längeren Aufenthalt im Fischkörper einbüßen und es unter Umständen erst im Laufe mehrwöchiger Kultur auf geeigneten Nährböden wieder gewinnen. Die Probe aus dem verendeten Karpfen hatte also wahrscheinlich neben *Ps. punctata* auch Keime einer nicht fluoreszierenden *Ps. granulata* enthalten. Die sehr sauerstoffbedürftigen Fluorescentenkeime dürften jedoch nur äußerst spärlich vorhanden gewesen sein, da der tote, nicht mehr ganz frische Fisch keine günstigen Entwicklungsbedingungen für sie bot. Vereinzelte Keime einer nicht fluoreszierenden *Ps. granulata* aber konnten bei der kulturellen Untersuchung leicht unerkannt bleiben, weil sich dieser Mikroorganismus in fast allen geprüften Stoffwechselleistungen (mit Ausnahme des Abbaus von Nitriten) ebenso wie *Ps. punctata*, schwächer als diese oder negativ verhält. Noch weniger leicht möglich war es bei der lichtmikroskopischen Untersuchung, vereinzelte Keime von *Ps. granulata* trotz dem Besitz zweier Geißeln unter einer Vielzahl eingeißeliger *punctata*-Keime zu entdecken, zumal die sehr zarten Geißeln bei der Präparation oft abreißen. Das Elektronenmikroskop wurde zu der Untersuchung nicht herangezogen.

Da der anfangs so in der Minderzahl vorhandene Fluorescent es vermocht hatte, *Ps. punctata* in der Kultur zurückzudrängen, lag es nahe, an eine antibiotische Erscheinung zu denken. Es wurde deshalb ein sogenannter Lochversuch angesetzt. In der Mitte einer Nähragarplatte wurde mit dem Korkbohrer ein Loch ausgestanzt und darauf die Platte mit *Ps. punctata* beimpft. In den zylindrischen Hohlräum wurde mit Hilfe einer Pipette das keimfreie Filtrat einer 48stündigen Bouillonkultur von *Ps. granulata* gefüllt und die Platte dann bei 22°C bebrütet. Das Experiment bestätigte unsere Vermutung. Im nächsten Umkreis des Loches kam *Ps. punctata* nicht zur Entwicklung, außerhalb einer Zone von etwa 1 cm Durchmesser fand jedoch Wachstum statt. Das in

den Nähragar diffundierende Bouillonfiltrat mit den Stoffwechselprodukten von *Ps. granulata* hatte also eine entwicklungshemmende Wirkung auf *Ps. punctata* ausgeübt. Damit war die Erklärung für das Überhandnehmen des Fluorescenten in der Kultur gefunden.

Bemerkenswert bei dieser Antibiose ist es, daß sie sich gegen einen nahe verwandten Mikroorganismus richtet. Antibiosen innerhalb einer Bakteriengattung sind meines Wissens bisher nicht bekannt. Nicht alle Stämme von *Ps. granulata* besitzen eine gleich hohe antibiotische Wirkung gegenüber *Ps. punctata*; in dem beschriebenen Falle war sie besonders stark ausgeprägt.

Antibiotische Vorgänge unter *Pseudomonas*-Bakterien, wie sie in der Kultur beobachtet werden konnten, spielen wahrscheinlich auch in der Natur eine Rolle. Möglicherweise liegt hierin eine der Ursachen für das unterschiedliche Vorkommen von *Ps. punctata* bei der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens begründet. Bei der bakteriologischen Untersuchung dieser Seuche in Norddeutschland wurde von SCHÄPERCLAUS regelmäßig *Ps. punctata* aus kranken Fischen isoliert, während bei unseren Untersuchungen an bauchwassersuchtkranken Karpfen aus süddeutschen Teichwirtschaften dieser Mikroorganismus keineswegs immer festzustellen war. Statt dessen trafen wir öfters fischpathogene Fluorescenten, und darunter am häufigsten *Ps. granulata*, in den Organen kranker Karpfen an. Nach unserer Erfahrung mit antibiotischen Stämmen von *Ps. granulata* in der Kultur erscheint es nicht ausgeschlossen, daß *Ps. punctata* gelegentlich auch im Fischkörper durch Antibiose von *Ps. granulata* verdrängt wird. Dies könnte den Krankheitsverlauf ungünstig beeinflussen, obwohl die beiden Mikroorganismen in ihrer Pathogenität für Karpfen weitgehend übereinstimmen, weil die vom Fischkörper zur Abwehr von *Ps. punctata* gebildeten Agglutinine nicht in gleichem Maße auch gegen *Ps. granulata* wirksam sind. Es wäre also eine Umstellung des Fisches in der Antikörperbildung notwendig, die Zeit und stoffliche Reserven erfordert.

Eine Beobachtung von L. SCHULTZ † an unserem Institut über Antagonismus zwischen fluoreszierenden *Pseudomonas*-Bakterien und Algenpilzen aus der Familie der *Saprolegniaceae* sei hier noch kurz erwähnt. Nachdem die mikrobiologische Untersuchung der Haut toter Karpfen ergeben hatte, daß Algenpilze auf dem Fischkadaver nicht zur Ansiedelung kommen, wenn Fluorescenten im Hautschleim vorhanden sind, wurde das Verhalten der von der Fischhaut isolierten Bakterien gegenüber Saprolegnien in der Kultur auf Fleischwasseragar (pH 7,2) geprüft. Dabei zeigten *Ps. fluorescens*, *Ps. granulata* und andere, nicht genauer differenzierte Fluorescenten eine stark wachstumshemmende Wirkung auf den Pilz. Alle nicht fluoreszierenden Bakterien der Fischhaut ebenso wie *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, verschiedene *Salmonellen*, *Bacillus subtilis* und andere übten dagegen keinen Einfluß auf das Wachstum des Pilzes aus, dessen Mycel die Bakterienkolonien sehr rasch überwucherte. Auch in diesem Falle lag also der Verdacht auf Antibiose nahe, doch wurden in den Versuchen von SCHULTZ andere entwicklungs-

hemmende Faktoren, wie Nahrungskonkurrenz und pH-Änderung des Nährbodens, nicht ausgeschlossen. Eine ähnliche Entwicklungshemmung, wie sie durch *Ps. granulata* und *Ps. fluorescens* bei Saprolegnien hervorgerufen wurde, verursachte auch *Bacterium prodigiosum*, dessen Farbstoff Prodigiosin auf viele Mikroorganismen antibiotisch wirkt.

Zusammenfassung

Es wird eine Antibiose bei *Pseudomonas*-Bakterien in der Kultur beschrieben. Die antibiotische Wirkung ging von einem Fluorescenten aus und richtete sich gegen *Pseudomonas punctata*. Da beide Mikroorganismen als Krankheitserreger bei der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens eine Rolle spielen, werden eventuelle Zusammenhänge zwischen dieser bakteriellen Antibiose und der Infektion der Fische erörtert. Zum Schluß wird auf eine antagonistische Erscheinung zwischen fluoreszierenden *Pseudomonas*-Bakterien und Algenpilzen hingewiesen.

Literatur

BRUNNER, G.: Die Fluorescens-Epidemie der Karpfen im Lichte neuerer Bauchwassersucht-Forschungen. Allg. Fischereizeitung 78, 349 (1953). — BRUNNER, G., u. R. STRIEGEL-JAXTHEIMER: Zur Bakteriologie der infektiösen Bauchwassersucht der Karpfen. Arch. Mikrobiol. 16, 341 (1951). — GARRE, C.: Über Antagonisten unter den Bakterien. Ref. im Zbl. Bakter. 2, 312 (1887). — SCHULTZ, L.: Experimentelle Untersuchungen an parasitischen Wasserpilzen im Hinblick auf den Schutz des Fisches vor Verpilzung. Vet. med. Diss. München 1951. — VOGEL, H.: Die Antibiotica. Nürnberg 1951.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen über die Veränderung der Carotinoidkomponenten von *Rhodotorula rubra* in Abhängigkeit von Ernährungsbedingungen*

Von
HELGA WITTMANN

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. August 1956)

ZOPF (1889) stellte bei Rothefen erstmals die Gegenwart eines Carotinoides in *Torula rubra* fest. LEDERER (1933) konnte bei einer Rothefe β -Carotin identifizieren und daneben ein bis dahin unbekanntes Carotinoid, das er Torulin nannte; ferner zwei weitere Farbstoffe, von denen der eine Kohlenwasserstoffcharakter zeigte, der andere Säureeigenschaften hatte. 1934 stellten FINK u. ZENGER bei Rothefen ebenfalls die beiden letztgenannten Farbstoffe fest. FROMAGEOT u. TCHANG (1938) fanden bei *Rhodotorula sanniei* insgesamt acht Carotinoide, von denen sieben Kohlenwasserstoffcharakter und einer Säureeigenschaften hatten. Davon konnten vier identifiziert werden: β -Carotin, γ -Carotin, Lycopin und Torulin. KARRER u. RUTSCHMANN (1946) untersuchten namentlich das saure Pigment von *Torula rubra*, das sie Torularhodin nannten und dessen Struktur im wesentlichen aufgeklärt werden konnte.

BONNER u. SANDOVAL (1946) stellten bei einer *Rhodotorula rubra* fünf Carotinoide fest: Torulin, β -Carotin, γ -Carotin, Phytofluen und Pigment A, welches nicht genauer bestimmt werden konnte. Torularhodin konnten sie nicht nachweisen. LODDER u. KREGER VAN RIJ (1952) fanden den sauren Farbstoff Torularhodin in verschiedenen, jedoch nicht in allen roten Stämmen der von ihnen untersuchten *Rhodotorula*-Arten.

Torulin ist in der Natur ziemlich weit verbreitet. Es wurde außer in *Rhodotorula rubra* noch in *Rh. sanniei*, *Rh. glutinis*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Lycogala epidendron* und *Dacromyces stillatus* gefunden. Torularhodin, ein Monocarbonsäure-Carotinoid, konnte bisher in *Rhodotorula rubra*, *Rh. glutinis*, *Rh. sanniei*, *Sporobolomyces roseus* und *Sp. salmonicolor* nachgewiesen werden.

Von den in *Rhodotorula*-Arten vorhandenen Carotinoiden sind Torularhodin und Torulin für die Rotfärbung verantwortlich. Die Zusammensetzung der Carotinoide in den einzelnen *Rhodotorula*-Arten ist verschieden und kann sich durch Kulturbedingungen ändern. Dadurch lassen sich vielleicht die unterschiedlichen Angaben in früheren Arbeiten über die Carotinoidzusammensetzung in Rothefen erklären.

Bei allen Untersuchungen an *Rhodotorula rubra* wurden jedoch übereinstimmend die zwei Komponenten Torulin und β -Carotin gefunden.

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1956.

Die eigenen Untersuchungen sollen allgemein über den Einfluß verschiedener Ernährungsbedingungen auf den Gesamtfarbstoffgehalt und auf die einzelnen Carotinoidkomponenten Aufschluß geben. Im einzelnen sollen näher untersucht werden: Die Natur und die quantitative Zusammensetzung der Carotinoide von *Rhodotorula rubra*, die quantitative Veränderung der Carotinoidzusammensetzung bei Änderung des Nährmediums (Kohlenstoff- und Stickstoffquellen), die Bedingungen für die Möglichkeit einer β -Carotinanreicherung, fördernde und hemmende Einflüsse auf die Carotinoidsynthese.

I. Methodik

1. Hefegewinnung

Bei allen Untersuchungen wurde mit *Rhodotorula rubra*, Stamm 3124 aus dem Institut für Mikrobiologie, Göttingen, gearbeitet. Die für eine ausreichende Farbstoffgewinnung nötige Menge an Hefezellen wurde in submersen Belüftungskulturen gewonnen; Kulturdauer stets 72 Std bei 27° C.

Um eine genügend große Impfmenge für die Belüftungskulturen zu erhalten, wurden die Hefen in Erlenmeyerkolben mit 30 cm³ Würzeagar bei 27° C kultiviert und zur Impfung 10—12 Tage alte Kulturen, in 10 cm³ aqua dest. suspendiert, verwendet. Die Impfmenge betrug im Durchschnitt 0,270 g Trockenhefe.

Alle Kulturen wurden künstlich belichtet. Als Lichtquelle diente eine normale 40 Watt Glühbirne. Nach LEDERER (1933) bildet *Rhodotorula* im Dunkeln nur wenig Farbstoff und erscheint hellrot; im Licht dagegen entstehen intensiv rot gefärbte Kulturen. Nach PRAUS (1952) beschleunigt Licht die Biosynthese der Carotinoide bei *Rhodotorula gracilis* in der Wachstumsphase. In der Fettbildungsphase erhöht Belichtung den relativen Gehalt an α - und β -Carotin gegenüber dem Tocopherol. Auch bei *Neurospora crassa* wurde ein günstiger Einfluß des Lichtes bei Gegenwart von Sauerstoff auf die Carotinoidbildung während der Wachstumsperiode beobachtet (HAXO, 1949; ZALOKAR, 1954).

Die Nährlösung, von der aus der qualitative und quantitative „Normalwert“ der Carotinoide bestimmt wurde, entsprach zum Teil einem von GOODWIN (1953) für *Rhodotorula* angegebenen Kulturmedium. Die Mengen der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen wurden aber erhöht, um eine auftretende Veränderung des Farbstoffgehaltes aus Mangel an Nährstoffen auszuschließen. Die Nährlösung für die submersen Belüftungskultur, die im folgenden als „Normalnährösung“ bezeichnet werden soll, gegenüber Nährmedien mit veränderten C- und N-Quellen, enthielt auf 1000 ml aqua dest.: Glucose 50 g, Asparagin 1,5 g, KH₂PO₄ 1,5 g, MgSO₄ 0,5 g, Aneurin 100 γ, pH-Wert 4,7.

Ein Zusatz von Silikon (Antischäummittel SH, Wacker) als Entschäumer war erforderlich wegen der starken besonders bei Absinken des pH-Wertes im Verlauf der Kultivierung auftretenden Schaumbildung. Die Belüftung der Kultur erfolgte mit Preßluft.

Nach 72 Std wurde die Hefe abzentrifugiert und einige Male mit dest. Wasser gewaschen. Dann wurde der Brei der roten Hefe mehrmals kurz mit Aceton zentrifugiert, ohne daß hier (also bei den intakten Zellen) schon eine Extraktion der Carotinoide erfolgte. Am Ende der Behandlung wurde eine poröse, bröckelige Masse erhalten, die 12 Std im Trockenschrank bei 65° C getrocknet wurde.

Die Angabe: „Hefetrockengewicht“ bezieht sich immer auf mit Aceton vorbehandelte Hefe, wobei Inhaltsstoffe der Zellen schon in Lösung gehen können, die dann bei einer Wägung nicht mehr mit einbezogen werden.

2. Extraktion der Carotinoide

Alle verwendeten Chemikalien waren p. a.-Substanzen; zum Teil erfolgte vor der Verwendung noch Destillation, bzw. Prüfung auf Reinheit.

Für die Extraktion von Carotinoiden aus Mikroorganismen sind zahlreiche Methoden beschrieben worden, die zum Teil auf einer Heißextraktion, zum Teil auf der Kaltextraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln, bzw. Lösungsmittelgemischen, oder auf der Vorbehandlung mit Alkalien oder Säuren beruhen. Nach PETERSON (1954) ist bei pigmentierten Hefen, die auf nicht-synthetischem Nährboden wuchsen, eine befriedigende Extraktion nur mit Aceton + starker Säure + Hitze möglich, während bei *Rhodotorula*, die auf synthetischem Nährboden wuchsen, die Carotinoide mit kaltem Aceton extrahiert werden könnten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Kaltextraktion mit Aceton ohne Vorbehandlung mit Säuren usw. durchgeführt; nach dem Trocknen wurde die vollständige Extraktion der Carotinoide erreicht. Vorversuche zeigten nämlich, daß bei diesen, auf rein synthetischem Nährboden gewachsenen Hefen, erst die Trocknung der Zellen bei 65° C während 12 Std die vollständige Extraktion ermöglicht. Auch die zerstörten Zellen, die ohne Trocknung im Trockenschrank mit Aceton extrahiert wurden, behielten stets einen Teil der Farbstoffe zurück.

Das so vorbehandelte Material kam mit wenig feinem Quarzsand und einer ausreichenden Menge Aceton in das Gefäß einer Kugelmühle, in das Stickstoff eingeleitet wurde, um eine oxydative Veränderung der Carotinoide weitmöglichst zu vermeiden.

Hier wurde es 6 Std lang zerrieben und extrahiert. Dann wurde auf einer mit Kieselgur belegten Nutsche abgesaugt und solange mit Aceton nachgewaschen, bis dieses farblos durchlief. Der Belag aus Kieselgur, zerstörten Hefezellen und Quarzsand war danach völlig farblos. Der Acetonextrakt wurde durch Zusatz von Wasser in Petroläther (p.a. Kp. 30–50° C) überführt. Die gefärbte Petrolätherlösung wurde über Nacht bei 0° C stehen gelassen. Dabei setzten sich farblose Verunreinigungen ab, die abgenutscht wurden, um eine Störung bei der späteren Trennung der Carotinoide zu vermeiden. Anschließend wurde mit einer 12%igen methanolischen Kalilauge während 14 Std im Dunkeln bei Zimmertemperatur und in Stickstoffatmosphäre verseift.

Vorversuche zeigten, daß die Dauer der Verseifung einen Einfluß auf die papierchromatographische Trennung hatte. Eine Verseifungszeit von 14 Std mit einer 12%igen alkoholischen Kalilauge erwies sich als optimal für die Trennung.

Die Extraktions- und Verseifungszeiten wurden immer genau eingehalten, um bei den folgenden Reihenuntersuchungen Fehler durch mögliche Veränderungen der Carotinoide während der Aufarbeitung soweit als möglich auszuschalten.

Nach Ablauf der Verseifung wurde vorsichtig mit soviel Wasser versetzt, daß gerade Entmischung eintrat. Die obere, orange-rot gefärbte Petrolätherschicht enthielt die epiphasischen Carotinoide. Die untere wasserhaltige, alkalische Methanolphase war rötlich-violett gefärbt und enthielt hypophatische Pigmente. Nach Abtrennung der epiphasischen Petrolätherlösung wurde die wäßrige Methanolösung, unter Zusatz von wenig Petroläther und Wasser, mit Essigsäure leicht angesäuert. Dabei ging der Farbstoff der hypophatischen Schicht leicht und vollständig in den Petroläther über, was auf seine Säurenatur schließen läßt. Alkoholische Alkalilauge entzog den Farbstoff einer Petrolätherlösung wieder vollkommen.

Die Lösung wurde säurefrei gewaschen, die beiden Petrolätherfraktionen vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet.

Gewöhnlich werden die beiden Pigmentfraktionen (epi- und hypophatische) nicht vereinigt, sondern getrennt chromatographiert. Da aber bei den im folgenden durchgeführten Reihenuntersuchungen die jeweils gebildete Farbstoffmenge auf

1 g Trockenhefe bezogen werden sollte, konnte bei der Trennung des Farbstoffgemisches mit Hilfe der Papierchromatographie nur mit einem Gesamtextrakt (epi- und hypophasische Carotinoide) gearbeitet werden.

Nach dem Trocknen wurde deshalb der intensiv rot gefärbte Gesamtextrakt im Vacuumexsiccator in Stickstoffatmosphäre auf genau 10 cm^3 eingeengt. Bei den Reihenuntersuchungen wurde jeweils die Menge des Extraktes weiterverarbeitet, die 1 g Trockenhefe entsprach.

Für die säulenchromatographische Trennung zur Identifizierung und Reinigung der einzelnen Carotinoide wurde jedoch eine beliebige Menge des Petrolätherextraktes verwendet.

3. Chromatographische Methoden

a) Säulenchromatographie

Zur Zerlegung des Carotinoidgemisches in die einzelnen Komponenten wurde die chromatographische Adsorptionsmethode benutzt. Als geeignetes Adsorbens wurde in Vorversuchen Aluminiumoxyd (sauer, Aktivitätsstufe 1, Woelm.) ermittelt. Die besten Trennungen wurden mit einer „Entwicklerlösung“ aus einem Gemisch von Petroläther Kp. $30-50^\circ\text{C}$ und Kp. $60-80^\circ\text{C}$ + einigen Tropfen Aceton erzielt.

Nach längerem Durchwaschen erschienen vier deutlich verschiedene gefärbte Zonen in der Säule. Nach maximaler Trennung der Zonen wurden diese mechanisch voneinander getrennt und mit den entsprechenden Lösungsmitteln eluiert. (Vgl. weiter unten.) Die gefärbten Eluate wurden vom Al-oxyd abgenutscht und die Filtrate durch Zugabe von Wasser in Petroläther überführt. Nach gründlichem Waschen der vier Petrolätherlösungen wurden diese im Vacuumexsiccator in N-Atmosphäre zur Trockne eingeengt. Erneut in Petroläther aufgenommen, wurden die einzelnen Fraktionen noch einmal getrennt chromatographiert und Verunreinigungen, soweit sie auftraten, abgetrennt. Nach erneuter Trocknung über Natriumsulfat und anschließender Einengung zur Trockne wurden die vier Rückstände in den für die spektrophotometrische oder spektroskopische Untersuchung geeigneten Lösungsmitteln gelöst.

b) Papierchromatographie¹⁾

Bisher erschienen nur wenige Arbeiten über die papierchromatographische Trennung von reinen Carotinoidgemischen. Am häufigsten noch wurden Blattpigmente mit Hilfe der Papierchromatographie aufgeteilt, wobei jedoch keine Trennung der Carotinoidfraktion erfolgte (GRANGAUD, 1952; ASAMI, 1952; LIND, LANE, 1953; BAUER, 1952). Zur Trennung eines reinen Carotinoidgemisches wurde von NUNEZ (1954) ein mit einer fettlöslichen Phase imprägniertes Papier vorgeschlagen.

Da eine quantitative papierchromatographische Trennung des Farbstoffgemisches bei Reihenuntersuchungen eine wesentliche Arbeitserleichterung darstellt, wurde eine Methode ausgearbeitet, die es gestattet, die 4 im Säulenchromatogramm gefundenen Zonen (die 4 verschiedenen Carotinoiden entsprechen) auch auf dem Papier zur Darstellung zu bringen. Wegen des verhältnismäßig raschen Ausbleichens ist die übliche 1- oder 2-dimensionale Papierchromatographie ungeeignet. Es wurde deshalb das Verfahren der Ringchromatographie angewandt (ZIMMERMANN u. NEHRING, 1952; BROCKMANN u. PATT, 1953). Da das Entwickeln eines solchen Chromatogrammes durchschnittlich nur 15 min dauert und das Papier dabei dauernd mit Lösungsmittel getränkt ist, erscheint es unwahrscheinlich, daß eine in Betracht zu ziehende Veränderung der Carotinoide eintritt. Auch wurden die einzelnen Zonen sofort nach ausreichend erfolgter Trennung eluiert.

¹⁾ Nähere Angaben über methodische Einzelheiten siehe Dissertation.

Als Chromatographierpapier diente das Filterpapier von Sch. u. Sch. 2043 b. Die beste Trennung wurde mit reinem Benzin Kp. 60—80° C erzielt. (Benzin für Analyse benzolfrei, Kp. 60—80° C, Riedel de Haen.) Ein höherer oder niedrigerer Kp. ergab keine einwandfreie Trennung.

In die Mitte des Papiers wurde der Petrolätherextrakt ringförmig mit einer feinen Pipette aufgetragen. Die Extrakte wurden immer sofort nach der Verseifung verarbeitet. Durch das Auftröpfeln des Lösungsmittels (im Durchschnitt fiel 1 Tropfen Lösungsmittel/sec auf das Papier) wurde der Gesamtextrakt in 4 gut voneinander entfernte und verschieden gefärbte Ringe getrennt, die den Zonen bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd entsprachen (Abb. 1).

Je nach der Menge des Extraktes, der von der jeweils gebildeten Hefemenge abhängig ist, wurden 3 bis 6 Papierchromatogramme entwickelt.

In dem vollständig entwickelten Rundchromatogramm erschien die äußerste Zone intensiv gelb gefärbt, die nächst innere gelb-orange, die 3. Zone rot-violett und der innerste Ring, der mit Benzin als Lösungsmittel nicht wandert, violett gefärbt. Sobald die Zonen ausreichend weit voneinander getrennt waren, wurden die 4 Ringe ausgeschnitten und der Farbstoff in entsprechenden Lösungsmitteln (Zone 1 und 2, von außen nach innen, mit Methanol, Zone 3 mit Aceton, Zone 4 mit Äther-Eisessig im Verhältnis 10: 1) durch Umschütteln und kurzes Stehenlassen in N-Atmosphäre vollständig aus dem Papier herausgelöst. Die Eluate der Zonen 1 bis 3 wurden im Scheidetrichter durch Zugabe von Wasser und wenig Petroläther in diesen überführt und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Eluat der Zone 4 wurde mit Wasser säurefrei gewaschen und verblieb in Äther. Im Vacuum-exsiccator wurden die 4 Carotinoidlösungen dann in N-Atmosphäre zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden anschließend für die densitometrischen Messungen im Photometer in je 5 cm³ Schwefelkohlenstoff gelöst. Die einzelnen Farben erfuhren dabei eine Änderung gegenüber der Färbung in Petroläther.



Photographie eines Chromatogramms

Abb. 1. Die Photographie zeigt ein fertig entwickeltes Chromatogramm mit den 4 Ringzonen. Von innen nach außen: Torularhodin, Torulin, γ -Carotin, β -Carotin

4. Spektralphotometrische Untersuchungsmethode

Die charakteristischen Absorptionsmaxima wurden mit dem Spektralphotometer von Zeiss Opton in Benzol bzw. Chloroform gemessen.

5. Spektroskopische Untersuchungsmethode

Da ein Spektralphotometer nur in beschränktem Umfang zur Verfügung stand, wurden die 4 verschiedenen Carotinoidlösungen bei allen Reihenuntersuchungen nur spektroskopisch auf ihre Absorptionsspektren mit dem Zeiss Handspektroskop untersucht, womit die Lage der 2—3 Absorptionsbanden gut abgelesen werden konnte. Die Lösung wurde in eine Keiluvette gefüllt, weil die Extrakte nicht immer

gleich konzentriert waren, und nur bei einer bestimmten Konzentration deutliche Absorptionsbanden sichtbar wurden. Die Lage der stärksten und breitesten Absorption jedes Carotinoids in CS_2 wurde notiert und für die Auswahl der Lichtfilter im Photometer, das für quantitative Messungen verwendet wurde, berücksichtigt.

6. Photometrische Bestimmungsmethode

Die unter verschiedenen Kulturbedingungen auftretende Menge eines Carotinoids wurde mit Hilfe densitometrischer Messungen im Leitz-Kompensations-Photometer ermittelt. Schichtdicke der Cuvette: 10 mm. Dazu wurden die 4 Rückstände, die nach der papierchromatographischen Trennung aus 1 g Trockenhefe erhalten worden waren, in je $5 \text{ cm}^3 \text{ CS}_2$ gelöst und mit den entsprechenden Filtern (siehe oben) photometriert.

Zur Aufstellung einer Eichkurve für jedes Carotinoid wurde eine ausreichende Menge Carotinoid-Extrakt papierchromatographisch getrennt und die durch Einengung im Vacuumexsiccator erhaltenen Rückstände gewogen. Da diese zum Teil etwas ölig blieben, wurde anschließend solange Stickstoff darüber geleitet, bis das Gewicht ziemlich konstant blieb. Da aber außerdem durch die Aufarbeitung des Extraktes und die papierchromatographische Trennung sicher Schmutzstoffe¹ in den gewogenen Rückständen enthalten sind, handelt es sich bei den Gewichtsangaben für die Carotinoide nur um Annäherungswerte.

Bei der Gleichmäßigkeit der durchgeführten Reihenuntersuchungen dürfte es sich aber fast immer um prozentual gleiche Verunreinigungen handeln, die für den Vergleich der jeweils gebildeten Carotinoidmenge nicht allzusehr ins Gewicht fallen.

II. Untersuchungsergebnisse und ihre Besprechung

1. Identifizierung der Carotinoide aus *Rhodotorula rubra*

Wie eingangs schon erwähnt, wurden in den untersuchten *Rhodotorula*-Arten bisher immer β -Carotin und Torulin festgestellt, während Torularhodin nicht in allen Fällen nachgewiesen werden konnte. Außerdem traten noch Lycoein, γ -Carotin und Phytofluen auf.

Bei den eigenen Untersuchungen wurden Extrakte verwendet, die auf der „Normalnährlösung“ in submersen Belüftungskulturen kultiviert wurden. Nach der Aufarbeitung des Rohextraktes (vgl. Methodik) wurde der Extrakt säulenchromatographisch getrennt. Es zeigten sich sofort vier verschiedene Zonen, die solange entwickelt wurden, bis sie durch farblose Zwischenschichten gut voneinander getrennt waren. Das Chromatogramm erschien dann (von oben nach unten betrachtet) folgendermaßen: **A**, lachsrote, schmale Zone (wandert fast nicht); **a**, farblose Zone; **B**, rot-violette, breite Zone; **b**, farblose Zone; **C**, gelb-orange, schmale Zone; **c**, farblose Zone; **D**, gelbe Zone. — Die einzelnen Zonen wurden nach mechanischer Trennung der Al-Oxyd-Säule eluiert.

A. Der Farbstoff der Zone A konnte nur mit Äther-Eisessig im Verhältnis 10 : 1 befriedigend eluiert werden. Die Lösung wurde säurefrei gewaschen und der Äther abgezogen. Bei der Verteilungsprobe zwischen

¹ Der Anteil der Verunreinigungen dürfte jedoch nicht groß sein, da bei gleicher Behandlung mit Hilfe dieser Methode auch sehr niedrige Werte erhalten wurden (z. B. 0,54 mg γ -Carotin).

Petroläther und 90%igem Methanol verhielt sich der Farbstoff im wesentlichen hypophasisch. Über die spektralphotometrische und spektroskopische Prüfung vgl. Tab. 1. Durch langsames Eindunsten einer Farbstofflösung in einem Methanol-Äther-Gemisch konnte einmal der Farbstoff kristallin in feinen, langen, dunkelroten Nadelchen erhalten werden.

Tabelle 1. Absorptionsbanden und -maxima der 4 Carotinoide von *Rhodotorula rubra*

Carotinoid	Lösungsmittel	Absorptionsbanden und -maxima in m μ	Absorptionsmaxima in m μ (gemessen)
Torularhodin	CS ₂		
	gemessen . .	580—585, 530—545, 500—525	—
	Literatur . .	582, 541, 502	
	Benzol		
	gemessen . .	550—560, 515—520, 480—490	557, 520, 485
	Literatur . .	557, 519, 485	
Torulin	Chloroform		
	gemessen . .	550—558, 510—520, 480—490	—
	Literatur . .	554, 515, (483)	
	CS ₂		
	gemessen . .	560—570, 515—530, 484—495	—
	Literatur . .	565, 525, 491	
β -Carotin	Benzol		
	gemessen . .	540—545, 500—508, 460—475	540, 503, 470
	Literatur . .	541, 503, 470	
	CS ₂		
	gemessen . .	520—535, 485—500, 457—466	—
	Literatur . .	533,5, 496, 463	
γ -Carotin	Chloroform		
	gemessen . .	500—515, 470—480, um 450	—
	Literatur . .	508,5, 475, 446	
	Benzol		
	gemessen . .	—	510, 477, 445
	Literatur . .	510, 477, 447	
	CS ₂		
	gemessen . .	510—525, 480—488, 450	—
	Literatur . .	520, 485, 450	
	Chloroform		
	gemessen . .	490—500, 460—470, —	497, 466, —
	Literatur . .	497, 466, —	

gemessen = die von mir gemessenen Werte

Literatur = die in der Literatur angegebenen Werte.

Die beobachteten langwelligen Absorptionsmaxima bzw. die langwellige Lage der Absorptionsbanden (Tab. 1) sind ein bezeichnendes Charakteristicum für Torularhodin. Ferner lassen das chromatographische Verhalten

(der Farbstoff wandert nicht an Al-oxyd mit Petroläther) und der Säurecharakter (vgl. Kap. I, 2), sowie das Verhalten bei der Verteilungsprobe und die Form der Kristalle die Bestimmung des Carotinoides als Torularhodin zu. Die in der Literatur für Torularhodin angegebenen Absorptionsmaxima stimmten gut mit den eigenen im Spektralphotometer und Spektroskop gemessenen überein.

B. Der Farbstoff dieser Zone wurde mit Methanol + Petroläther eluiert und durch Zugabe von Wasser in den Petroläther überführt. Bei der Verteilungsprobe verhielt sich das Carotinoid epiphatisch.

Die in Tab. 1 aufgeführten Werte für Absorptionsmaxima und -banden sowie die Eigenschaften des Farbstoffes stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten für Torulin gut überein, ebenso das chromatographische und epiphatische Verhalten. Aus den genannten Gründen wurde der Farbstoff der Zone B. als Torulin bestimmt.

C. Die schmale, gelb-orange Zone C des Säulenchromatogrammes wurde mit einem Gemisch aus Methanol + Petroläther eluiert. Bei der Verteilungsprobe erwies sich der Farbstoff als rein epiphatisch. Die gemessenen Absorptionsbanden und -maxima werden aus Tab. 1 ersichtlich. Das chromatographische und epiphatische Verhalten, sowie die Lage der Absorptionsmaxima und -banden lassen die Charakterisierung des Carotinoides als γ -Carotin zu.

D. Die intensiv gelbgefärzte Zone D ließ sich verhältnismäßig leicht beim Entwickeln des Chromatogrammes durchwaschen, oder mit Methanol + Petroläther aus dem Al-Oxyd eluieren. Bei der Verteilungsprobe zeigte der Farbstoff epiphatisches Verhalten. Kristallisation gelang aus einer Petrolätherlösung durch langsames Eindunsten, wobei orange-rote, rhombische Blättchen auftraten.

Über gemessene und in der Literatur angegebene Absorptionsmaxima bzw. -banden vgl. Tab. 1. Das chromatographische und epiphatische Verhalten des Farbstoffes, die Absorptionsmaxima und -banden in Chloroform- und Schwefelkohlenstofflösung sprechen dafür, daß dieses Carotinoid mit β -Carotin identisch ist.

Aus dem Carotinoidextrakt von *Rhodotorula rubra* konnten im Verlauf der Untersuchungen also die 4 Carotinoide Torularhodin, Torulin, β -Carotin und γ -Carotin gefunden und bestimmt werden.

Ob noch andere Carotinoide, z. B. farblose fluoreszierende Polyene wie Phytofluen und Phytoen, von dem untersuchten Stamm gebildet werden, konnte nicht entschieden werden. Es wurden bei den folgenden Reihenuntersuchungen immer nur diese 4 gefärbten Carotinoide getrennt, bestimmt und quantitativ untersucht.

2. Einfluß der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen auf die Carotinoidbildung

Eingehende Untersuchungen zur Biosynthese der Carotinoide und über die Verwertbarkeit verschiedener C- und N-Quellen wurden von GOODWIN, SCHOPFER u. GROB und anderen an *Phycomyces blakesleeanus* durchgeführt. SCHOPFER u. GROB (1950) stellten eine stark verminderte Carotinbildung mit Ammoniumlactat fest; eine Zugabe von Acetat belebte das Wachstum und die Carotinbildung. Später (1952) wurde gezeigt, daß sich Acetat als einzige C-Quelle bei Gegenwart von Ammoniumnitrat günstig auf die Carotinbildung auswirkt. Es soll bei Verwendung als einzige C-Quelle eine Vorstufe des β -Carotin sein. Nach GOODWIN (1952) soll Glykokoll bei Ersatz des Asparagins speziell die β -Carotinproduktion erhöhen. Eine normale β -Carotinbildung wurde mit Maltose erreicht, war mit Fructose und Xylose jedoch reduziert.

Bei *Surcina lutea* fand nach ARNAKI (1952) mit Lactat als einziger C-Quelle trotz starker Vermehrung keine Carotinoidbildung statt. Acetat zeigte nur eine gering fördernde Wirkung. Die qualitative Zusammensetzung der Carotinoide von *Corynebacterium michiganense* konnte durch Fütterung mit verschiedenen Aminosäuren nicht beeinflußt werden (SAPERSTEIN u. STARR, 1954). Für *Torula shibatana* wurde Glycerin als wirksamste C-Quelle für Wachstum und Carotinoidbildung angegeben. Komplexe N-Verbindungen sollen einfachen Verbindungen überlegen sein. (ISHII RYUICHIRO, 1952).

Den „Umsatz von Carotinoiden in höheren Pflanzen“ untersuchte H. BEEKMANN (1954).

Bei den folgenden Untersuchungen wurden bei konstanter N-Quelle (Asparagin) verschiedene C-Quellen geprüft und die dabei auftretende Änderung der 4 Carotinoide quantitativ festgestellt. Dasselbe wurde mit konstanter C-Quelle (Glucose) und verschiedenen N-Quellen durchgeführt. Als Vergleichswerte dienten dabei die Carotinoidwerte, die in der „Normalnährösung“ (oben S. 374) erzielt wurden.

Bei allen Untersuchungen wurden auf 1000 ml Aqua dest. neben KH_2PO_4 , MgSO_4 und Aneurin immer 20 g Kohlenstoff und 0,35 g Stickstoff gegeben. Der pH-Wert wurde immer auf 4,7 eingestellt.

A. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Carotinoidbildung

In Belüftungskulturen wurden die in Tab. 2 und 3 aufgeführten C-Quellen untersucht und bei der Carotinoidbestimmung folgendermaßen verfahren:

Die 1 g Trockenhefe entsprechende Menge Carotinoidextrakt wurde papierchromatographisch in die 4 Carotinoide getrennt. Die daraus erhaltenen Rückstände wurden in je 5 cm³ CS₂ gelöst und im Photometer die Extinktionswerte für jeden Farbstoff gemessen. Für Torularhodin wurde der Filter 530 m μ benutzt, da die stärkste und breiteste Absorption, die im Zeiss Handspektroskop beobachtet worden war, im Bereich dieses Filters lag. Für Torulin wurde aus dem gleichen Grunde der Filter 510 m μ , für β -Carotin ebenfalls Filter 510 m μ und für γ -Carotin Filter 495 m μ für die Messungen benutzt.

1. Glucose: das Wachstum war damit sehr gut; der pH-Wert veränderte sich im Verlauf von 72 Std nicht. — 2. Fructose: ergab ebenfalls gutes Wachstum, eine pH-Verschiebung während der Kultivierung

trat nicht auf. — 3. Glycerin: ermöglichte gutes Wachstum, der pH-Wert stieg nur geringfügig an. — 4. Rohrzucker: Wachstum nur mäßig, intensive Färbung. Geringer pH-Anstieg. — 5. Lactose: der pH-Wert stieg im Verlauf der Kultivierung auf 6,5 an, das Wachstum war sehr gering, die Färbung der Kultur schwach. — 6. Acetat: mit Na-acetat wuchsen die Hefen nur sehr mäßig; der pH-Wert stieg auf 5,4 an.

Über Farbstoffgehalt, gebildete Hefemenge und pH-Werte vgl. für 1—6 Tab. 2 und 3.

Tabelle 2. *Hefetrockengewichte und pH-Werte bei verschiedenen C-Quellen und konstanter N-Quelle (Asparagin) aus 1000 ml Nährlösung*

C-Quelle	Trockengewicht g	pH-Wert
Glucose	6,23	4,7
Fructose	5,37	4,7
Glycerin	4,15	4,8
Rohrzucker	3,78	4,9
Lactose	0,74	6,5
Na-acetat.	0,73	5,4

Die Werte stellen Mittelwerte aus durchschnittlich 5 Belüftungskulturen dar, Maximalwert fett.

Tabelle 3. *Annäherungswerte der 4 Carotinoide/1 g Trockenhefe bei verschiedenen C-Quellen und konstanter N-Quelle (Asparagin) in mg*

C-Quelle	Torula-rhodin	Torulin	β -Carotin	γ -Carotin	Gesamt-farbstoff-gehalt
Glucose	9,68	2,36	23,03	1,73	36,80
Fructose	17,58	2,32	37,59	1,37	58,86
Glycerin	20,02	1,39	15,68	0,54	37,63
Rohrzucker.	10,41	3,04	59,40	2,00	74,85
Lactose	5,54	0,76	16,12	0,70	23,12
Na-acetat	6,06	1,01	30,06	1,37	38,50

Diese Werte stammen aus Mittelwerten, die aus durchschnittlich 5 Kulturen mit jeweils 5—15 chromatographischen Trennungen erhalten wurden; sie wurden anhand einer Eichkurve berechnet. Maximalwerte fett.

Es soll noch einmal betont werden, daß die angegebenen Werte in Milligramm infolge Verunreinigungen, die bei der Aufarbeitung der Extrakte und durch die papierchromatographische Trennung erfolgt sein können, sicherlich etwas zu hoch liegen (vgl. Anm. 1, S. 378). Da aber die Extinktionswerte der densitometrischen Messungen bei den durchschnittlich 5 untersuchten Kulturen immer gut übereinstimmten, kann der mögliche Fehler wohl als konstant angenommen werden.

Der höchste Gesamtcarotinoidgehalt wurde mit Rohrzucker erreicht; dann folgen mit Abstand Fructose, Na-acetat, Glycerin, Glucose und Lactose. Die für das Wachstum günstigsten C-Quellen werden aus Tab. 2

ersichtlich. Bemerkenswert war der hohe β -Carotingehalt bei Rohrzucker, der weder mit Fructose noch Glucose allein erreicht wurde. Acetat, das von einigen Autoren als ein Vorläufer für die Carotinbildung angesehen wird, lieferte nur für β -Carotin einen etwas erhöhten Wert. Torularhodin- und Torulinbildung sprachen ausgesprochen schlecht auf Acetat an. Tab. 4 zeigt eine Zusammenstellung der förderlichsten C-Quellen.

Tabelle 4. Die förderlichsten C-Quellen für die Bildung der einzelnen Carotinoide

Torularhodin	Torulin	β -Carotin	γ -Carotin
Glycerin	Rohrzucker	Rohrzucker	Rohrzucker
Fructose	Glucose	Fructose	Glucose
Rohrzucker	Fructose	Na-acetat	Fructose
Glucose	Glycerin	Glucose	Na-acetat
Na-acetat	Na-acetat	Lactose	Lactose
Lactose	Lactose	Glycerin	Glycerin

B. Einfluß der Stickstoffquelle auf die Carotinoidbildung

In Belüftungskulturen wurden folgende N-Quellen untersucht:

1. Asparagin: es ergaben sich die gleichen Verhältnisse wie unter A. 1 beschrieben. — 2. Alanin: mäßiges Wachstum und Färbung, der pH-Wert sank ab. — 3. Glutaminsäure: ermöglichte sehr gutes Wachstum, der pH-Wert lag am Ende der Kultivierung bei 4. — 4. Harnstoff: gutes Wachstum, der pH-Wert sank auf 4 ab. — 5. Glykokoll: sehr gutes Wachstum, vergleichbar dem mit Glutaminsäure, End-pH-Wert 4. — 6. Histidin: schwaches Wachstum, Färbung der Kultur normal.

Tabelle 5. Hefetrockengewichte und pH-Werte bei verschiedenen N-Quellen und konstanter C-Quelle (Glucose) aus 1000 ml Nährlösung

N-Quelle	Trockengewicht g	pH-Wert
Glutaminsäure	7,46	4,0
Glykokoll	7,03	4,0
Asparagin	6,23	4,7
Harnstoff	5,80	4,0
Ammoniumnitrat	4,10	3,2
Alanin	3,48	4,0
Histidin	1,18	4,2

Die Werte stellen Mittelwerte aus durchschnittlich 5 Belüftungskulturen dar.

Der pH-Wert sank bis 4,2 ab. — 7. NH_4NO_3 : der pH-Wert sank im Verlauf von 72 Std auf 3 ab, das Wachstum und die Färbung waren dadurch nicht beeinträchtigt. Die Zellen waren, gegenüber den früher auf anderen Nährösungen erhaltenen, fast nicht schleimig. Die Carotinoide gingen schon bei häufiger Vorbehandlung mit Aceton vollständig in Lösung.

Über Farbstoffgehalt, gebildete Hefemenge und pH-Werte vgl. für 1—7 Tab. 5 und 6.

Tabelle 6. Annäherungswerte der 4 Carotinoide/1 g Trockenhefe bei verschiedenen N-Quellen und konstanter C-Quelle (Glucose) in mg

N-Quelle	Torularhodin	Torulin	β -Carotin	γ -Carotin	Gesamt-farbstoff-gehalt
Asparagin	9,68	2,36	23,03	1,73	36,80
Alanin	9,97	1,40	9,96	0,56	21,89
Glutaminsäure	8,09	0,79	14,38	1,13	24,39
Harnstoff	11,92	0,61	23,34	0,97	36,83
Glykokoll	10,68	0,71	15,35	0,97	27,70
Histidin	16,02	3,33	16,09	1,49	36,93
NH_4NO_3	10,75	3,60	24,90	1,69	40,94

Für diese Werte gilt das unter Tab. 3 Gesagte.

Der höchste Gesamtecarotinoidgehalt wurde mit NH_4NO_3 erreicht, es folgen Histidin, Harnstoff, Asparagin, Glykokoll, Glutaminsäure und Alanin, das für die Gesamtecarotinoidbildung am ungünstigsten war.

Bei Variation der N-Quelle und gleicher C-Quelle wurde im Durchschnitt weniger Farbstoff gebildet als bei Änderung der C-Quelle. Dagegen war das Wachstum bei einigen N-Quellen stärker. Der höchste Gehalt an β -Carotin wurde mit NH_4NO_3 erreicht. Er war jedoch, verglichen mit den Werten, die bei der Variation der C-Quellen erhalten wurden, nur mäßig. Für die Torularhodin- und Torulinbildung besonders günstig war Histidin, während die Werte für β - und γ -Carotin damit unter dem „Normalwert“ lagen. Bei Verwendung von Alanin wurde die Bildung von β - und γ -Carotin, sowie die Torulinproduktion gehemmt. Die für das Wachstum günstigsten N-Quellen zeigt Tab. 5.

Tabelle 7. Die förderlichsten N-Quellen für die Bildung der einzelnen Carotinoide

Torularhodin	Torulin	β -Carotin	γ -Carotin
Histidin	NH_4NO_3	NH_4NO_3	Asparagin
Harnstoff	Histidin	Harnstoff	NH_4NO_3
Glykokoll	Asparagin	Asparagin	Histidin
Alanin	Alanin	Histidin	Glutaminsäure
NH_4NO_3	Glutaminsäure	Glykokoll	Harnstoff
Asparagin	Glykokoll	Glutaminsäure	Glykokoll
Glutaminsäure	Harnstoff	Alanin	Alanin

3. Kombination der für die Carotinoidbildung günstigsten C- und N-Quelle

Die größte Gesamtfarbstoffmenge wurde bei den untersuchten C-Quellen mit Rohrzucker erreicht, bei den N-Quellen mit Ammoniumnitrat. Es wurde daher geprüft, ob sich bei Kombination beider die fördernde Wirkung auf die Farbstoffbildung summiert und ob sich außerdem die β -Carotinproduktion dadurch noch steigern lässt. Die übrigen

Bedingungen blieben unverändert. Nach Ablauf von 72 Std war die Hefekultur intensiv rot gefärbt, das Wachstum war gering; der pH-Wert war auf 3,4 gefallen. Das Trockengewicht betrug im Mittel aus 1000 ml Nährlösung 2,73 g. Tab. 8 zeigt das Ergebnis.

Tabelle 8. Annäherungswerte der 4 Carotinoide/1 g Trockenhefe mit Rohrzucker und NH_4NO_3 in mg

Farbstoff	Gewicht	Gesamtfarbstoffgehalt
Torularhodin	16,69	
Torulin	5,08	
β -Carotin	18,61	41,79
γ -Carotin	1,41	

Die Gesamtmenge des gebildeten Farbstoffes entsprach etwa der Menge, die bei Verwendung von Glucose- NH_4NO_3 gebildet wurde (36,80 mg). Der Wert für Rohrzucker-Asparagin lag jedoch wesentlich höher (74,84 mg). Bei der Kombination stieg also der Gehalt an Torularhodin und Torulin noch an, während er für β - und γ -Carotin abfiel (vgl. dazu Tab. 3 u. 6). Dies ist um so bemerkenswerter, als gerade mit Rohrzucker und Asparagin die höchsten β - und γ -Carotinmengen erreicht worden waren und der Gehalt an β - und γ -Carotin auch mit NH_4NO_3 und Glucose über dem „Normalwert“ lag. Hier wird offensichtlich die fördernde Wirkung des Rohrzuckers, die er bei der Kombination mit Asparagin hat, bei Verwendung von NH_4NO_3 gehemmt. Bei der Torularhodin- und Torulinbildung verstärkt sich dagegen die Wirkung bei der Kombination. Die Bildung der einzelnen Carotinoide ist also in starkem Maße abhängig von der Zusammenstellung des Nährmediums.

4. Einfluß höherer Aneurinkonzentration auf die Carotinoidbildung

FRIEND u. GOODWIN (1954) stellten bei *Phycomyces* fest, daß in Vitamin-B₁-reichen Medien mehr β -Carotin gebildet wurde als in Aneurin-armen. Eine qualitative Veränderung des Carotin- und Polyengehaltes trat jedoch nicht auf. Bei höheren Aneuringaben trat eine Wachstumshemmung ein. Nach STARR u. SAPERSTEIN (1953) bewirkt bei *Corynebacterium poinsettiae* eine Steigerung der Aneurin-gaben eine qualitative Veränderung der Carotinoidzusammensetzung, wobei sich die Färbung der Kulturen verstärkte. Bei höheren Gaben (100 μ /100 ml Nährlösung) trat neben Spirilloxanthin und Lycoxanthin als neues Carotinoid Cryptoxanthin auf.

Eigene Versuche sollten den Einfluß der Aneurinkonzentration auf die Carotinoidproduktion bei *Rhodotorula rubra* prüfen und vor allem feststellen ob die β -Carotinbildung gesteigert werden kann und ob dabei neue Carotinoidkomponenten auftreten.

Als Nährlösung diente die „Normalnährlösung“ mit Asparagin und Glucose. Es wurde der Farbstoffgehalt der 4 Carotinoide/1 g Trockenhefe für 3 verschiedene Konzentrationen bestimmt: 100 γ , 300 γ , 600 γ Aneurin/1000 ml Nährlösung. Der pH-Wert von 4,7 war nach Ablauf von 72 Std nicht verändert.

Die Trockengewichte zeigt Tab. 9. Bei steigender Aneurinkonzentration konnte zum Teil schon äußerlich eine Zunahme der Farbintensität in den Belüftungskulturen beobachtet werden. Bei der chromatographischen Trennung zeigte sich, daß auch bei einer hohen Aneurinkonzentration keine qualitative Veränderung der ursprünglich gefundenen Carotinoidzusammensetzung eintrat, wie dies bei *Corynebact. poinsettiae* beobachtet worden war.

Tabelle 9. Annäherungswerte der 4 Carotinoide/1 g Trockenhefe bei verschiedenen Aneurinkonzentrationen in mg

Aneurin/ 1000 ml	Trocken- gewicht aus 1000 ml	Torula- rhodin	Torulin	β -Carotin	γ -Carotin	Gesamt- farbstoff- gehalt
100 γ	6,23 g	9,68	2,36	23,03	1,73	36,80
300 γ	4,62 g	17,70	4,92	29,80	2,04	54,46
600 γ	4,59 g	14,11	3,43	34,10	1,67	53,31

Hinsichtlich des Gesamtecarotinoidgehaltes fällt ein starker Anstieg bei erhöhter Aneurinkonzentration auf, der bei 600 γ Aneurin jedoch zum Stillstand gekommen ist. Bei einer Erhöhung der Aneurinkonzentration auf 300 γ stieg der Gehalt an Torularhodin sprunghaft, derjenige der übrigen Carotinoide etwas an. Eine weitere Erhöhung auf 600 γ brachte für Torularhodin, Torulin und γ -Carotin einen leichten Abfall in der Bildung, während der β -Carotingeinhalt langsam noch weiter anstieg. Der hohe Gesamtfarbstoffgehalt bei 300 γ wird also durch eine erhöhte Bildung aller 4 Carotinoide bewirkt, während der immer noch über dem „Normalwert“ liegende Gehalt an Farbstoff bei 600 γ hauptsächlich auf die erhöhte Bildung von β -Carotin zurückgeht. Eine Steigerung der β -Carotinproduktion kann also bei *Rh. rubra* durch hohe Aneuringaben erzielt werden.

5. Einfluß von Malonsäure auf die Carotinoidbildung

BEEKMANN stellte bei etiolierten Weizenkeimlingen eine Steigerung der Carotinoidbildung und gleichzeitige leichte Wachstumshemmung bei Zugabe von Malonamid fest. Zurückgeführt wird diese Förderung „auf eine Hemmung des Krebszyklus durch die Malonsäure, wobei zusätzliche Bausteine für den Carotinoidaufbau verfügbar werden, die sonst über den Citronensäure-Cyclus abgebaut würden“.

Im folgenden Versuch sollte festgestellt werden, ob durch Zugabe von Malonsäure zur Nährlösung bei *Rhodotorula rubra* eine Förderung der Carotinoidbildung erfolgt. Um eine Schädigung der Hefezellen durch die Säurewirkung zu vermeiden, wurde Malonamid anstelle von Malonsäure

verwendet. Die Malonamidkonzentration der „Normalnährlösung“ war im 1. Versuch 0,01 molar, im 2. 0,05 molar. Nach üblicher Aufarbeitung wurden die in Tab. 10 verzeichneten Ergebnisse erhalten (End-pH-Wert 4,7, 4,0 und 3,5).

Tabelle 10. Annäherungswerte der 4 Carotinoide/1 g Trockenhefe in mg bei Zusatz von Malonamid

Malonamid/ 1000 ml N. L.	Trocken- gewicht aus 1000 ml	Torula- rhodin	Torulin	β -Carotin	γ -Carotin	Gesamt- farbstoff- gehalt
ohne Malonamid	6,23 g	9,68	2,36	23,03	1,73	36,80
Malonamid 0,01m	4,04 g	14,86	3,51	33,79	1,80	53,91
Malonamid 0,05m	2,26 g	3,63	1,78	28,79	1,48	35,68

Bei geringem Malonamidzusatz war bei allen Carotinoiden eine Zunahme zu beobachten. Das Wachstum war etwas zurückgegangen. Bei der stärkeren Konzentration fielen die Werte für alle Carotinoide wieder ab. Besonders stark wurde die Bildung der ungesättigteren Carotinoide (Torularhodin, Torulin) gehemmt. Der Abfall des pH-Wertes kann nicht der maßgebliche Hemmungsfaktor sein, da in Kulturen mit NH_4NO_3 und Glucose der pH-Wert sogar auf 3 abgefallen war, was keinen hemmenden Einfluß, hauptsächlich auf die Bildung von Torularhodin und Torulin, ausübte.

6. Einfluß von Diphenylamin auf die Carotinoidbildung

Die Hemmung der Carotinsynthese durch DPA wurde von GOODWIN et. al. (1953) an *Phycomyces blakesleeanus* näher untersucht. Es wurde eine fast vollständige Hemmung der Bildung der ungesättigteren Carotinoide beobachtet, während DPA die Produktion der gesättigteren Komponenten belebte. Kulturen, die bei Gegenwart von DPA gewachsen waren und große Mengen der Phytofluengruppe enthielten, wandelten diese nicht in die ungesättigteren Carotinoide um, wenn sie auf Medien übertragen wurden, die kein DPA enthielten. Nur β -Carotin wurde wieder gebildet. Ähnliche Beobachtungen wurden bei *Rhodospirillum rubrum* gemacht.

Bei den eigenen Untersuchungen sollte das Verhalten der Carotinoidbildung nach Zusatz von DPA bei *Rhodotorula rubra* festgestellt werden. Es wurde dabei mit einem Würze-Agar-Nährboden gearbeitet, der 0,1% DPA enthielt. Beimpft wurde mit einer Suspension von 10 bis 12 Tage alten Hefen, die auf Würze-Agar bei 27° C gewachsen waren.

Sobald die geimpfte Hefe angewachsen war, verschwand die rote Färbung völlig, die Kulturen erschienen farblos; das Wachstum war, im Gegensatz zur Farbstoffbildung, nicht beeinträchtigt. Nach Rückimpfung dieser farblosen Hefezellen auf Würze-Agar, der kein DPA enthielt, wurden, sobald die Hefe angewachsen war, wieder gefärbte Kulturen erhalten. Diese waren im Vergleich zu Kulturen ohne DPA-Passage

sogar viel intensiver rot gefärbt (Tab. 11). Eine qualitative Änderung der Farbstoffzusammensetzung trat dabei nicht auf. Die intensivere Färbung der Kulturen, die sich nach 6 Tagen nachweisen ließ, ließ schon nach der ersten Überimpfung (auf Würze-Agar) nach 14 Tagen nach und unterschied sich dann nicht mehr von den anderen Kulturen ohne DPA-Passage.

Die farblosen Zellen, die nach Zusatz von DPA gewachsen waren, zeigten im Vergleich zu denen auf Würze-Agar eine starke Zellvergrößerung mit lebhafter Sprossung (Abb. 2 und 3).

Tabelle 11. Annäherungswerte¹ der 4 Carotinoide/1 g Trockenhefe in mg auf Würze-Agar

	Torularhodin	Torulin	β -Carotin	γ -Carotin	Gesamtfarbstoffgehalt
auf Würze-Agar 12 Tage alt ²	12,98	1,69	20,02	0,82	35,51
auf Würze-Agar nach DPA-Passage 6 Tage alt	15,80	2,84	22,10	1,28	42,02

¹ Die Werte sind nicht mit den früher angeführten Werten zu vergleichen, die bei Verwendung flüssiger synthetischer Nährösungen erhalten worden waren.

² Diese Zusammensetzung erleidet in Abhängigkeit von der Wachstumszeit eine, allerdings nur geringfügige, Verschiebung.



Abb. 2. *Rhodotorula rubra* auf Würze-Agar-Nährboden mit 0,1% DPA, 6 Tage alt, 1250× vergr.



Abb. 3. *Rhodotorula rubra* auf Würze-Agar-Nährboden, 6 Tage alt, 1250× vergr.

IV. Rückblick

Aus früheren Untersuchungen über die Carotinoide in verschiedenen *Rhodotorula*-Arten wird ersichtlich, daß die Carotinoidzusammensetzung in den einzelnen Arten stark variiert. Die bei den eigenen Untersuchungen in *Rhodotorula rubra* gefundenen Carotinoide (Torularhodin, Torulin, β -Carotin, γ -Carotin) wurden alle schon früher, wenn auch in anderer Zusammensetzung und gegebenenfalls durch andere Carotinoide erweitert, in *Rhodotorula*-Arten nachgewiesen. Für *Rhodotorula rubra* fanden sich,

soweit die diesbezügliche Literatur zu übersehen ist, keine Angaben von quantitativen Untersuchungen über den Gehalt der einzelnen Carotinoide bei verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffsäurenährung.

Bei *Rh. shibatana* und *Rh. sanniei* übte nach FROMAGEOT u. TCHANG sowie ISHII Glycerin gegenüber Glucose als einzige C-Quelle eine fördernde Wirkung auf die Farbstoffbildung aus. Nach den eigenen Untersuchungen wird durch Glycerin bei *Rh. rubra* nur die Torularhodinbildung gefördert, während die Werte für die übrigen drei Komponenten weit unter dem „Normalwert“ liegen. Glycerin übt also in diesem Falle eine spezifisch fördernde Wirkung nur auf die Torularhodinbildung aus, gleichsam auf Kosten der übrigen drei Farbstoffe. An *Rh. sanniei* konnten FROMAGEOT u. TCHANG bei Kulturen, die auf Glycerin gewachsen waren, eine intensivere Färbung beobachten als auf Vergleichskulturen mit Glucose. Da *Rh. sanniei*, wie nach neueren Untersuchungen feststeht, das saure Pigment Torularhodin enthält, stimmt diese Beobachtung gut mit den eigenen Untersuchungen überein, denn eine intensivere Rotfärbung beruht in erster Linie auf einer Zunahme des Torularhodingehaltes.

Mit Rohrzucker wurde der höchste Gesamtfarbstoffgehalt bei den untersuchten C-Quellen erreicht, bei den N-Quellen mit Ammoniumnitrat. Die vorliegenden Untersuchungen machen deutlich, daß die Ausbildung eines jeden einzelnen Carotinoides von der gebotenen C- und N-Quelle abhängig ist, wenn dies auch manchmal im Gesamtfarbstoffgehalt nicht deutlich zum Ausdruck kommt.

Die Kombination der für die Ausbildung der Carotinoide günstigsten C- und N-Quelle (Rohrzucker, $\text{NH}_4 \text{NO}_3$) hat nicht auf alle Komponenten den gleichen fördernden Effekt; die β - und γ -Carotinbildung wird sogar gehemmt. Der Gesamtfarbstoffgehalt liegt deshalb nicht so hoch, wie man nach den Einzeluntersuchungen von Rohrzucker und NH_4NO_3 hätte erwarten können.

Der Einfluß der Aneurinkonzentration auf die Ausbildung der Carotinoide wurde schon für *Phycomyces* und *Corynebacterium* untersucht (FRIEND u. GOODWIN, STARR u. SAPERSTEIN). *Phycomyces* bildet in aneurinreichem Medium mehr β -Carotin, bei *Corynebacterium* trat eine qualitative Änderung der Carotinoidzusammensetzung auf. Bei den eigenen Untersuchungen wurde bei *Rh. rubra* auch bei einer hohen Aneurinkonzentration keine qualitative Veränderung der ursprünglich gefundenen Carotinoidzusammensetzung gefunden. Dagegen erfolgte auch hier eine Mehrproduktion von β -Carotin, die noch bei einer Konzentration anhielt, bei der die übrigen 3 Carotinoidwerte schon wieder abfielen. Auf das Wachstum wirkte der erhöhte Aneurinzusatz, wie für *Phycomyces*, leicht hemmend.

Über den Einfluß von Malonsäure auf die Carotinoidbildung liegen nur Untersuchungen an höheren Pflanzen vor (BEEKMANN). Es konnte über-

einstimmend damit eine erhöhte Farbstoffbildung beobachtet werden. Die fördernde Wirkung der Malonsäure geht bei stärkerer Konzentration in eine hemmende über, die unter Umständen durch eine Anhäufung der Produkte, die durch die Hemmung des Krebs-Cyclus anfallen, hervorgerufen wird.

Die hemmende Wirkung von DPA auf die Carotinoidsynthese wurde schon bei vielen carotinoidführenden Mikroorganismen beobachtet (GOODWIN et al., TURIAN et al.). Auch bei den eigenen Versuchen wuchsen die Hefen nach DPA-Zusatz farblos. Die auf anschließend DPA-freiem Nährboden auftretende intensivere Rotfärbung (verursacht durch Zunahme aller 4 Carotinoide) könnte man als „Schockwirkung“ auffassen. Dieses Phänomen kann mit dem Auffrischen der ursprünglichen Eigenschaften bei Bakterien und Pilzen, die durch lange Passagen auf künstlichen Nährböden kontinuierlich abgeschwächt worden sind, verglichen werden.

Über das Verhältnis von Wachstumsgröße und Carotinoidbildung lassen sich nach den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen keine allgemein gültigen Aussagen machen.

Zusammenfassung

1. Es wurden eine einfache Methode zur vollständigen Extraktion der Carotinoide aus *Rhodotorula rubra* und eine Methode zur papierchromatographischen Trennung eines Carotinoidgemisches (Ringchromatogramm) ausgearbeitet.
2. In *Rhodotorula rubra* (Stamm 3124, Institut für Mikrobiologie, Göttingen) wurden 4 Carotinoide gefunden und als Torularhodin, Torulin, β -Carotin und γ -Carotin identifiziert.
3. Verschiedene Kohlenstoffquellen (Glucose, Fructose, Glycerin, Rohrzucker, Lactose, Acetat) hatten einen sehr unterschiedlichen Einfluß auf die quantitative Ausbildung der einzelnen Carotinoidkomponenten. Mit Rohrzucker wurde der höchste Gesamtfarbstoffgehalt erreicht.
4. Von verschiedenen Stickstoffquellen (Asparagin, Alanin, Glutaminsäure, Harnstoff, Glykokoll, Histidin, Ammoniumnitrat) war NH_4NO_3 für die Farbstoffbildung am förderlichsten. Auch die Stickstoffquelle wirkte sich sehr unterschiedlich auf die Bildung der 4 Carotinoide aus.
5. Die Wirkung der für die Carotinoidbildung optimalen C- und N-Quelle (Rohrzucker- NH_4NO_3) summiert sich bei der Kombination bei der Stoffe nicht.
6. Bei Erhöhungen der Aneurinkonzentration trat eine Steigerung der Carotinoidbildung ein, die bei der höchsten der untersuchten Konzentrationen jedoch außer für β -Carotin wieder nachließ.

7. Ein geringer Zusatz von Malonsäure zur Nährlösung steigerte die Bildung aller 4 Carotinoide.

8. Zusatz von Diphenylamin bewirkte eine vollständige Hemmung der Carotinoidbildung. Auf anschließend DPA-freiem Nährboden wurde eine verstärkte Carotinoidbildung („Schockwirkung“) beobachtet.

9. Eine auffallende Steigerung der β -Carotinproduktion wurde gefunden bei Verwendung von Rohrzucker-Asparagin und zunehmendem Aneuringehalt.

Herrn Prof. Dr. A.-RIPPEL-BALDES danke ich für Anregung und Unterstützung bei der Durchführung vorliegender Arbeit.

Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

ARNAKI, M.: Biochem. Z. **323**, 376 (1952). — ASAMI, M.: Bot. Mag. (Tokyo) **65**, 217 (1952).

BAUER, H.: Naturwissenschaften **39**, 88 (1952). — BEEKMANN, H.: Z. f. Botanik **42**, 88 (1952). — BONNER, I., A. SANDOVAL et. al.: Arch. Biochem. **9**, 10 (1946). — BROCKMANN, H., u. P. PATT: Naturwissenschaften **40**, 221 (1953).

FRIEND, J., u. T. W. GOODWIN: Biochemic. J. **57**, 434 (1954). — FROMAGEOT, C. u. J. L. TCHANG: Arch. Mikrobiol. **9**, 424 (1938). — FROMAGEOT, C., u. J. L. TCHANG: Arch. Mikrobiol. **9**, 434 (1938). — FINK, H., u. E. ZENGER: Wschr. Brauerei **51**, 89 (1934).

GARTON, G. H. et. al.: Biochemic. J. **48**, 154 (1951). — GRANGAUD, R.: Bull. Soc. Chim. biol. **34**, 754 (1952). — GOODWIN, T. W.: Biochemic. J. **48**, 154 (1951); **50**, 273 (1952); **53**, 531 (1953); **53**, 538 (1953); **57**, 434 (1954).

HAXO, F.: Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **12**, 169 (1955). — Arch. Biochem. **20**, 400 (1949). — HESSE, G.: Chemiker-Ztg. **1950**, 477. — Adsorptionsmethoden im chem. Laboratorium. Berlin: Gruyter Verlag 1943.

ISHII, R.: J. Fermentation Technol. (Japan) **30**, 350, 390 (1952).

KUHN, R., u. H. BROCKMANN: Z. physiol. Chem. **44**, 206 (1932). — KARRER, P., u. E. JUCKER: Carotinoide, Monographie. Basel: Verlag Birkhäuser 1948. — KARRER, P., u. J. RUTSCHMANN: Helvet. chim. Acta **26**, 2109 (1943); **28**, 795 (1945); **29**, 355 (1946).

LIND, LANE: Plant. Physiol. **28**, 325 (1953). — LEDERER, E.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **197**, 1694 (1953). — These, Paris, 1938. — Helv. chim. Acta **26**, 2109 (1943). — Helv. chim. Acta **29**, 355 (1946). — LODDER, J., u. N. KREGER VAN RIJ: The Yeasts. A taxonomic study. Amsterdam 1952.

NUNEZ, G.: Bull. Soc. Chim. Biol. **36**, 411 (1954). — NAKAYAMA, G., et. al.: Antonie van Leeuwenhoek, J. Mikrobiol. Serol. **20**, 217 (1954).

PRAUS, R.: Chem. Listy **46**, 643 (1952). — PETERSON, W.: J. Bacter. **67**, 708 (1952).

RUTSCHMANN, J.: Diss. Zürich, 1946.

SAPERSTEIN, S., u. M. STARE: J. Gen. Mikrobiol. **10**, 85 (1954). — SCHOPFER, W. H.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **118**, 3 (1935); C. r. Acad. Sci. (Paris) **205**, 445 (1937). — SCHOPFER, W. H., u. E. GROB: Experientia (Basel) **8**, 140 (1952); **6**, 419 (1950). — STARR, M., u. S. SAPERSTEIN: Arch. of Biochem. a. Biophysics **43**, 157 (1953).

ZALOKAR, M.: Arch. of Biochem. a. Biophysics **50**, 71 (1954). — ZECHMEISTER, L.: Chem. Rev. **34**, 267 (1944). — Carotinoide, Monographie. Berlin: Springer 1934. — ZIMMERMANN, G., u. K. NEHRING: Angew. Chem. **63**, 556 (1952). — ZOPF, W.: Z. wiss. Mikrosk. **6**, 172 (1889). — ZSCHEILE, F. P.: Bot. Review **7**, 587 (1941).

(From the Haskins Laboratories, New York,
and the Marine Station, Millport, Scotland)

The Development of Artificial Media for Marine Algae

By

L. PROVASOLI, J. J. A. McLAUGHLIN and M. R. DROOP

(*Eingegangen am 24. September 1956*)

The culturing of marine algae has proceeded slowly since MIQUEL (1890—93) succeeded in growing a few diatoms in the laboratory. Until recently most media were composed of sea water or sea water-like artificial solutions which are prone to precipitate because of the presence of several salts in concentration near saturation. In order to avoid precipitates such media must be sterilized either by filtration or by bringing them for a few seconds to 118—120°C (15 lb./in.²). Phosphates, iron and other trace metals, if added to the medium before sterilization, cause precipitates that can be avoided only by tedious aseptic addition to the sterile base. Precipitates *per se* are not objectionable and poorly-soluble salts might be an effective way to provide a non-toxic reservoir of nutrients (PRINGSHEIM, 1946b); however it is difficult to reproduce precisely the same kind of precipitate in a medium as complex as sea water and the difficulty in repeating results is a common complaint from the early days (ALLEN and NELSON, 1910, p. 441). The addition of soil extract to sea water enriched with minerals ("Erd-SCHREIBER", FOYN, 1934a) while still presenting the difficulties mentioned above, provided a marine medium better suited for the growth of a variety of marine organisms (BARKER, 1935; GROSS, 1937).

In the last few years the recognition that many algae needed vitamins (PROVASOLI and PINTNER, 1953) and the inclusion of vitamins or organic extracts containing them in marine media has greatly increased the number of algae which it has been possible to culture axenically. The use of chelating substances (HUTNER, PROVASOLI, SCHATZ and HASKINS, 1950) has permitted the development of marine media which are not dependent on soil extract and natural sea water for their heavy metal control. Such synthetic solutions are more reproducible and appropriately enriched support at least the growth of a wide variety of algae. The goal of analysing ecological problems of the phytoplankton by the use of bacteria-free cultures under controlled laboratory conditions now seems more nearly attainable.

Natural sea water media

The first cultures of marine algae (diatoms) were achieved by MIQUEL in 1890—93. He observed that the waters of lakes, ponds, and the sea could not support in the laboratory continued and luxuriant growth of algae. Natural waters had to be enriched by the addition of some mineral salts that he compounded in the famous solutions A and B (table 1).

These solutions, soon neglected for fresh-water work because new formulae took hold, became the standard method for enriching sea water after the work of ALLEN and NELSON (1910). The original formula and the numerous modifications proposed

Table 1. *Sea water inorganic enrichments of the MIQUEL-type*
Solution A

	MIQUEL (1890)	ALLEN and NELSON (1910) "MIQUEL Sea water"	KILIAN (1911)	KETCHUM and REDFIELD (1938)	MATUDAIRA (1942)
MgSO ₄	10 g.				
NaCl	10 g.				
Na ₂ SO ₄	5 g.				
NH ₄ NO ₃	1 g.		1 g.		1 g.
KNO ₃	2 g.	20.2 g.	2 g.	20.2 g.	2 g.
NaNO ₃	2 g.		2 g.		2 g.
KBr	0.2 g.				0.2 g.
KI	0.2 g.				0.1 g.
H ₂ O	100 g.	100 g.	100 g.	100 g.	100 ml.
quantity of sol. A added to 1 l. sea water	40 drops (2 ml.?)	2 ml.	2 ml.	0.55 ml.	1 ml.

Solution B

	MIQUEL (1890)	ALLEN and NELSON (1910) "MIQUEL Sea water"	KILIAN (1911)	KETCHUM and REDFIELD (1938)	MATUDAIRA (1942) ¹
MgSO ₄				4 g.	
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	4 g. ²	4 g.	4 g. ²	4 g.	4 g.
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	4 g. ³	4 g.	4 g. ³	4 g. ²	4 g.
HCl conc.	2 ml.	2 ml.	2 g.	2 ml.	1 ml.
FeCl ₃ (melted)	2 ml.	2 ml.	2 g.	2 ml.	
H ₂ O	80 ml.	80 ml.	80 ml.	100 ml.	100 ml.
quantity of sol. B added to 1 l. of sea water	20 drops (1 ml.?)	1 ml.	1 ml.	0.5 ml.	1 ml.

¹ Besides sol. A and B, MATUDAIRA adds: 1 ml. of sol. C (ferric chloride 1 g./100 ml.) 1 ml. of sol. D (3/20 n NaHCO₃), 0.5 ml. of sol. E (SiO₂, as Na silicate, 1 g./liter) and 1 ml. of sol. F (MnCl₂ 0.4 mg., H₃BO₃ 0.4 mg., CuSO₄ 0.02 mg., H₂O 100 ml.) to 80 ml. of sterile sea water to which sol. A and B have been added. Sterilize at 90° C. for 30 minutes, decant off the precipitate before adding sol. C, D, E, and F.

² Anhydrous. ³ "dry" CaCl₂.

allow the growth of bacteria-free cultures of a few unexacting photoautotrophic organisms and bacterized cultures of many algae.

Inspection of the components of solution A reveals that MIQUEL designed it primarily for enriching fresh-water because some of its components (Mg, Na, K, Br, I, Cl, and SO_4) are found in low concentrations in fresh-water and are quite abundant in sea water. While MIQUEL employed it as such, even for enriching sea water, ALLEN and NELSON simplified solution A by eliminating the salts present in sea water as obviously unnecessary. They found that the nitrates were the active components and that KNO_3 could replace completely the whole of solution A. KILIAN (1911), KETCHUM and REDFIELD (1938), MATUDAIRA (1942), and others (table 1) suggested several modifications of solution A.

Solution B on the contrary has been seldom modified, though it has been employed at different concentrations. Its addition to sea water or fresh-water causes a precipitate upon sterilization even at 70°C. According to MIQUEL, this precipitate is necessary to the growth of freshwater algae but the enriched sea water should be freed of it by decanting the supernatant aseptically.

ALLEN and NELSON have made a detailed analysis of the components of MIQUEL's solutions and conclude that: (a) both solutions A and B are needed; (b) the nitrates are the only active ingredients of solution A for enriching sea water; (c) the beneficial action of solution B is only partially due to the addition of nutrients, because the analysis of the precipitate shows that almost all the phosphate and calcium, and all the iron added were precipitated; (d) the precipitate itself or single additions of the components of solution B are ineffective. ALLEN and NELSON concluded (p. 456) that the action of this solution B might be a "protective" one, i. e. "any removal or neutralization of harmful substances", since the combined addition of calcium and phosphate or of animal-charcoal could replace it. It might also be observed that solution B lowers the pH of sea water and that the formation of a precipitate seems to be the essential feature because precipitates are formed by all effective combinations, solution B, calcium and phosphate, and animal charcoal [which according to THORPE (in ALLEN and NELSON, p. 431) contains large quantities of Ca and Mg phosphates]. The protective action might be due to a co-precipitation of substances present in sea water in concentrations nearing toxicity at a pH lower than that of sea water.

ALLEN and NELSON grew, in persistent but bacterized cultures, many of the ecologically important diatoms (*Asterionella*, *Biddulphia*, *Chaetoceros*, *Coscinodiscus*, *Nitzschia*, *Rhizosolenia*, *Scletonema*, *Thalassiosira*) and reported that "MIQUEL sea water" supports growth also of several species of unidentified Rhodophyceae, Myxophyceae, filamentous Chlorophyceae (*Enteromorpha*, *Vaucheria*, etc.) and even young plants of *Laminaria*. This later observation led DREW (1910) to cultivate this alga artificially and so to discover its early life history. However, according to ALLEN and NELSON, "throughout the work we have had very great difficulty, in spite of much care and many precautions, in obtaining consistent results. It may even happen that, in two flasks containing the same culture medium, inoculated with the same culture of diatom and standing side by side, under exactly identical conditions, so far as can be recognized, quite different degrees of growth will be observed" (p. 436-37). This type of inconsistency is quite familiar all through the literature (e. g. ALLEN and NELSON, 1910; WILSON, 1951).

Differences in sea water itself may play a role: ALLEN and NELSON found consistently that, when not enriched, "outside sea water" (collected well outside Plymouth breakwater) was less favourable than the "tank" water (water taken from the closed circulation of the tanks of Plymouth's aquarium) where excretory products of marine organisms accumulate. This latter water supports, without artificial enrichment, the

growth in the tanks of minute naviculoid diatoms, also species of *Ectocarpus*, *Cladophora*, *Enteromorpha*, and *Vaucheria*, but it is quite unfavourable to planktonic diatoms or large seaweeds such as *Fucus* and *Laminaria* (the latter grows in outside sea water enriched with solutions A and B).

However, even in the presence of bacteria, the mineral enrichments do not support growth of all the marine algae. FØYN (1934) in his search for a good medium for a *Cladophora* formulated the "Erd-SCHREIBER" medium, composed of SCHREIBER's (1927) mineral sea water enrichment to which is added soil extract (table 2). Extracts of humus substances had proved useful for growing many species of freshwater algae which would not otherwise thrive in culture (PRINGSHEIM, 1912, 1913, 1926). FØYN classified the different marine solutions for their ability to grow *Cladophora* in the following order of increasing effectiveness: pure sea water, SCHREIBER's medium, ALLEN and NELSON medium ("MIQUEL sea water"), KILIAN medium, sea water soil extract, Erd-SCHREIBER.

Erd-SCHREIBER is a true step forward. Besides growing the algae which thrive in the ALLEN and NELSON medium it has permitted the unialgal culturing of *Cladophora* and *Ulva* (FØYN, 1934 a and b), of *Acetabularia* (HÄMMERLING, 1934), of *Dunaliella*¹ sp. and *Prorocentrum* (GROSS, 1934, 1937), of *Peridinium trochoideum*, *Exuviaella baltica* and *Syracosphaera carterae* (BRAARUD, 1951). Erd-SCHREIBER has since been used extensively for unialgal cultures of marine diatoms and flagellates at Plymouth (PARKE, 1949, 1955) and Burnham-on-Crouch (BUTCHER, 1952). GROSS (1937) had found that practically any sample of sea water, if enriched with the Erd-SCHREIBER components, gives a thriving culture of several species of small (2—10 μ) chrysomonads and cryptomonads, thus revealing a new and abundant category of nanoplankton not retained by the finest net. One might tend to discount the importance of these μ -flagellates because of their minute size, but they are ubiquitous and abundant and because of their small size are the food of many early animal larvae. Two of these, *Pyramimonas grossii* and *Isochrysis galbana*, have proved to be the choice experimental food organisms for the larvae of the European oyster (BRUCE, KNIGHT and PARKE, 1940). Media similar to Erd-SCHREIBER were employed by BARKER (1935) and by SWEENEY (1951) for several dinoflagellates. BARKER grew in bacteria-free culture *Prorocentrum micans* and *P. gracile* and two unidentified *Peridinium* and, in bacterized culture, two *Gonyaulax*, *Exuviaella*, and a *Ceratium*. SWEENEY grew bacteria-free *Gymnodinium splendens*.

Prorocentrum had been grown bacterized by GROSS, but in contrast to BARKER, this author had been unable to grow *Ceratium* in Erd-SCHREIBER. BARKER's success might have been due to his having prepared the medium with "aged" sea water.

Although the Erd-SCHREIBER type of media represent a definite improvement over the MIQUEL-ALLEN and NELSON type they do not eliminate the latter's chief defects: precipitates and inconsistent results. Better results are achieved by the precaution of sterilizing the sea water and the enrichment separately or by filtration. The usual, more reliable and less bothersome sterilization at 15 lb./in.² (121°C.) causes precipitates and erratic results unless the exposure at 121°C. is limited to one minute, which is scarcely sufficient to ensure complete sterilization. The success of these media may depend in great part on the type of "aged" sea water and soil employed for the extract and its age: SWEENEY (1951) finds that her soil extract becomes active one month after preparation and loses its activity 2—3 months later. This, however, is not our experience with our extracts.

The "aged" sea water that BARKER and SWEENEY employ is ordinary sea water which has stood in large glass bottles in the dark for months or years. The authors believe that during this period a complete mineralization has occurred as a result of

¹ Referred to by GROSS as *Chlamydomonas*.

Table 2. Sea water enrichments

	Foyn's SCHREIBER BER. (1927)	Foyn's Erd. SCHREIBER (1934a)	BARKER (1935)	SWEENEY (1951)	GOLDBERG <i>et al.</i> (1951)	SPENCER (1954)	SWEENEY (1954)	HAXO & SWEENEY (1955)	WILSON & COLLIER (1955)
NaNO ₃	10 mg.	10 mg.	—	—	—	Varied	—	—	—
KNO ₃	—	—	10 mg.	20.2 mg.	20.2 mg.	—	20.2 mg.	20.2 mg.	—
NH ₄ Cl	—	—	—	—	—	Varied	—	—	0.1 mg.
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2 mg.	2 mg.	—	—	—	—	—	—	—
K ₂ HPO ₄	—	—	1 mg.	3.5 mg.	Varied	—	3.5 mg.	3.5 mg.	—
KH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FeCl ₃	—	—	0.01 mg.	0.1 mg.	—	—	0.097 mg.	0.097 mg.	0.05 mg.
Fe Citrate	—	—	—	—	0.24 mg.	0.01 mg.	—	—	—
MnCl ₂	—	—	—	—	0.0075 mg.	0.013 mg.	0.0045 mg.	0.0075 mg.	0.0075 mg.
Na ₂ HAsO ₄	—	—	—	—	—	0.018 mg.	—	—	—
CoCl ₂	—	—	—	—	—	0.013 mg.	—	—	—
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02 mg.
NaHCO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1 mg.
Na ₂ S · 9 H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1 mg.
EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B ₁₂	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1 µg.
Thiamine HCl	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0 mg.
Biotin	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05 µg.
Soil extract	—	—	—	—	—	—	—	—	2 ml.
Sea water	100 ml.	100 ml.	2 ml.	4 ml.	—	—	—	—	2 ml.
Aged sea water	—	—	100 ml.	100 ml.	100 ml.	75 ml.	75 ml.	75 ml.	95 ml.
Distilled water	—	—	—	—	—	25 ml.	25 ml.	25 ml.	5 ml.

bacterial activity. This might be true but it is more probable that the bacterial growth has replenished the water with products of their metabolism and lysis, some of which may be growth factors.

It is to be expected, therefore, that these media may be difficult to reproduce exactly in other laboratories because of the different types of soil, and the different aging and bacterial flora of the "aged" sea water. SWEENEY's 1954 medium (table 2) is an improvement in that it eliminates the soil extract which is replaced by the addition of the active principles for *Gymnodinium splendens*: vitamin B₁₂ at ample level and ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) as a substitute for the metal-chelating activity of the natural humic acids of soil extract. "Aged" sea water, however, is retained in this medium.

Artificial sea water

As ALLEN and NELSON had already expressed clearly, the ideal aim is to grow organisms in artificially prepared solutions. Besides eliminating the difficulties due to the complex and variable composition of natural sea water and permitting the simplification of media by experimental evaluation of the relative needs for the different ions, "synthetic" solutions are necessary to the completion of nutritional studies.

It is understandable that, in tackling afresh this difficult problem, most authors designed artificial media to be as close as possible to the available analyses of sea water, with the consequence that their formulae became more complex as the analysis became more precise. The simple formula of PERRIER (1890) was employed for the great aquarium of oysters at the World Fair of Paris. The formula of HERBST (1897), based on the analysis of FORCHAMMER of the seawater between Naples and Sardinia was employed to rear larvae of sea urchins. PRINGSHEIM (1946a, p. 28) used a solution similar to HERBST's for several euryhaline organisms, among them *Dunaliella salina*. Another type of HERBST's artificial sea water, enriched with MIQUEL solutions and sucrose, was employed by IMAI and HATANAKA (1950) to grow bacterized cultures of a marine *Monas*.

ALLEN and NELSON were the first to try an artificial sea water for *algae*, a solution based on the molecular concentrations of sea water determined by VAN'T HOFF (1905). The mineral solution enriched with MIQUEL's solutions A and B supported the growth of *Coscinodiscus* in four instances (i. e. four isolated flasks); attempts to repeat this result failed. A new mineral solution based on DITTMAR's (1884) analysis of sea water was composed by ALLEN (1914) and served for his experiments on *Thalassiosira gravida*. The artificial sea water was prepared with pure Kahlbaum chemicals, enriched with phosphate, nitrate and iron, and with the pH adjusted with NaHCO₃. Alone it failed to support growth but the addition of a small quantity (1—4 ml./100) of sea water permitted excellent cultures comparable with those in enriched sea water. Employing the addition of 1 ml. of sea water ALLEN made the first analysis of the flexibility of marine organisms toward concentrations of major elements. The salinity could be varied from 17—50‰ without affecting growth [confirmed with other organisms by BRAARUD (1951) and PROVASOLI, McLAUGHLIN and PINTNER (1954)]; Ca, Mg, and K were necessary but could be varied within very wide limits (confirmed by PROVASOLI *et al.* (1954)). The need for an addition of a few milliliters of sea water could not therefore be due to exacting requirements for major elements; nor could it be eliminated by adding bromides, iodides, nitrite, gold, aluminium, strontium and lithium. Several simple experiments pointed to an organic substance active in trace concentrations: a dilute water extract of *Ulva* was active while its ash was inactive; "tank" water was the best source; water from Plymouth Sound was better than the less polluted water of the English Channel.

Putrified peptone was effective while several amino- and organic acids were inactive. ALLEN remarked that these effects may be due to products of the metabolism of bacteria and suggested an organic micronutrient similar to the first vitamin which had just been discovered by FUNK. How prophetic he was! It is really impressive to read this work and to see his alertness and acuteness in postulating that differences in productivity of coastal and oceanic waters may be due to the auxotrophy of algae and their need for micronutrients. This idea, disregarded by the majority, was followed up vigorously by HARVEY, KYLIN and their followers.

PEACH and DRUMMOND (1924) grew bacteria-free *Phaeodactylum tricornutum* (*Nitzschia closterium* forma *minutissima*) in ALLEN's "DITTMAR" artificial sea water enriched with the ALLEN-MIQUEL nutrients, while BARKER (1935) found that this artificial sea water enriched with nitrate and phosphate with and without the addition of soil extract supported as well bacteria-free growth of a *Peridinium* and *Cryptomonas* sp. as did "aged" sea water; *Prorocentrum micans* and *P. gracile* developed poorly, while *Eutreptia* did not grow, even in the presence of bacteria in a single duplicate experiment. Development was however much more erratic than in "aged" sea water medium, a possible indication that growth in the artificial base was due to carry-over. RYTHER (1954) employed a modification of the artificial sea water of MCCLENDON *et al.* (1917) for growing bacteria-free cultures of *Nannochloris atomus*, *Stichococcus cylindricus* (?), and *Phaeodactylum tricornutum* ("*Nitzschia closterium*").

CHU (1946a), following the extensive sea water analysis of LYMAN and FLEMING (1940) and THOMPSON and ROBINSON 1932) composed a complex artificial sea water (Solution A) in which he could grow in bacterized culture *Chaetoceros decipiens*, *Coscinodiscus excentricus*, *Ditylum brightwellii*, *Fragilaria striata*, *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira decipiens*. *Laminaria* ash could substitute for the trace metal solution. LEVRING (1946) employed for growing germlings of *Ulva lactuca* an artificial sea water based on the compilation of the sea water components made by SVERDRUP, JOHNSON and FLEMING (1942) with additions from NODDACK and NODDACK (1939). The same medium was later employed by PETERS (1948) for bacterized cultures of *Enteromorpha intestinalis*. Essentially, CHU's and LEVRING's media are similar and represent a definite improvement over previous synthetic media because they contain trace metals. This was borne out by the knowledge that sea water itself, enriched with nitrates and phosphates is not an adequate medium for the majority of algal species. It is not surprising that artificial media, copied from sea water and similarly enriched, can support the growth of only a few autotrophic and less exacting species such as *Nannochloris* and *Stichococcus* (RYTHER, 1954).

The addition of trace metals became imperative when it was found that some of the growth-promoting substances contained in sea water were inorganic. ALLEN and NELSON (1910) had already noted differences in fertility in sea water collected in different localities and the poor quality of the "offshore" waters. DE VALERA (1940) found that the superficial waters of the *Fucus-Ascophyllum* zone permit the germination and normal development of the zygotes of *Enteromorpha*, while the waters of 30 meter depth allow only a slow and stunted growth. H. KYLIN (1941, 1942, 1943), employing germinating zygotes of *Enteromorpha* and *Ulva* as test organisms and counting the number of cells produced in a fixed time, added nutrients to the infertile waters of 30 meter depth until he obtained a growth equal to that produced by the waters of the littoral zone, making what he termed the biological analysis of the conditions responsible for their fertility.

It can be concluded from his results that the waters of 30 meter depth are poor in nitrates, phosphates, iron and manganese. A. KYLIN (1943, 1945), employing the same techniques found that an addition of Zn, Mn, Fe and Co stimulated growth

while nickel, aluminium and cadmium were inert; aluminium and cadmium became toxic at concentrations above 10^{-4} and 10^{-5} respectively.

HARVEY (1947) concluded that Ni, Ga, Co, Zr, Mo, V, Zn and Cu are present in sufficient concentration in the inshore waters because their addition did not affect the growth rate of a marine *Dunaliella*¹. These waters contained less N, P, and Fe than is required for maximal growth and manganese was the limiting factor for *Dunaliella*. Manganese was not, however, the limiting factor for *Coscinodiscus excentricus* in the same waters.

Later H. KYLIN found that waters of 70 meter depth are even poorer in trace metals than those of 30 meter depth and concluded that the fertility of the inshore waters is due to their relative richness in nitrates, phosphates and trace metals and that these important elements for plant growth diminish progressively with depth and distance from the shore (H. KYLIN, 1946).

Unfortunately biological assays performed with bacterized cultures cannot admit of precise interpretation, particularly when organic substances but also when mineral and trace constituents are in question. To give an extreme example, the action of glucose, some organic and amino-acids, and also some growth factors on *Ulva* were studied by KYLIN (1942) and LEVRING (1946). Since these substances induce heavy growth of bacteria, increased growth of the alga cannot be interpreted as a direct action on the algae. Any product of bacterial metabolism might be responsible, from growth factors to KREBS cycle intermediates, or more simply, observed effects may be due merely to the creation of a reducing environment rich in carbon dioxide.

The beneficial action of soil or algal extracts may reflect the need for trace metals or might be interpreted as a way of providing growth factors, or even pH and r_H buffering. Soil extract is a wonderful trace element solution chelated with humic acids, while sea weeds have been found to effect a manifold concentration of trace metals from sea water (BLACK and MITCHELL, 1952). B₁₂ was synthesized by 70% of soil bacteria examined by LOCHHEAD and THEXTON (1951) and many algae contain B₁₂ (ROBBINS, HERVEY and STEBBINS, 1951; HASHIMOTO, 1954). But these extracts contain many other biologically active substances, the nucleic acid components, amino-acids, etc. which can be responsible for increased growth of an appropriate organism.

A recent example may illustrate the unreliability of results obtained with bacterized cultures. It is now established by one of us (DROOP, 1955b) that *Skeletonema costatum* in bacteria-free culture requires vitamin B₁₂. LEVRING (1945) had found that *Enteromorpha intestinalis*, *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, and *Ceramium rubrum*, were among the seaweeds whose extracts stimulated the growth of *Skeletonema* in bacterized cultures, while *Chondrus crispus* and *Scytonymus lamentaria* were not. According to the analyses of ROBBINS *et al.* (1951) only *Ceramium rubrum* and *Enteromorpha intestinalis* contain good quantities of B₁₂ (0.05—0.1 µg. per gram of dry alga) while *Fucus* and *Ascophyllum* are poor in this vitamin. The *Skeletonema*-inactive *Chondrus* contains 0.01—0.04 µg.

Results obtained by adding small quantities of vitamins to bacterized cultures are more indicative and more, though not completely, reliable. HARVEY (1955, p. 107) found that bacterized cultures of *Chaetoceros decipiens*, *Nitzschia seriata* and *Skeletonema costatum* gave no or only limited growth in enriched natural sea water, and that the addition of B₁₂ gave abundant cultures. These results indicate that the particular sample of sea water was poor in vitamin B₁₂ and suggest, but do not, because of the presence of bacteria, definitely establish a B₁₂ requirement on the part of the diatoms.

¹ Referred to by HARVEY (1947) as *Chlamydomonas*.

Other attempts to find the nature of the growth-promoting substances contained in sea water were made by HARVEY (1939) who found that two different types of organic substances were necessary for continued growth of *Ditylum brightwellii* in bacterized cultures. One could be extracted from sea water, soil or algal extracts and is a sulphur-containing organic acid whose effect could be replaced by several organic compounds containing divalent sulphur, such as cysteine, methionine, glutathione, thiamine and biotin, and also by sodium sulphide. MATUDAIRA (1942) confirmed the effect of sulphides and cysteine with bacterized cultures of *Skeletonema*. LEVRING (1945) found cystine and asparagine stimulating for *Skeletonema*. R. A. LEWIN (personal communication) finds in aerated cultures that sulphides are responsible for extremely good growth of a strain of *Skeletonema* even in the absence of bacteria; on the other hand, in still cultures growth of the Millport strain of this diatom is obtained without divalent sulphur unless the medium (S 36) has been allowed to stand 10 days or more between autoclaving and inoculating. The effects observed with divalent sulphur will probably be interpreted more easily as a physical than as a vitaminological phenomenon.

Development of marine media in New York

At the beginning of our studies in New York the best available media were (1) sea water enriched with soil extract (FØYN's Erd-SCHREIBER) and (2) LEVRING's artificial sea water, which represented the most complete sea water substitute of chemically known composition. Erd-SCHREIBER was used extensively both as an isolation and a conservation medium. In it were isolated *Gyrodinium californicum*, *Syracosphaera carterae*, *Phormidium persicinum*, and several *Nitzschia* sp. The medium however forms an abundant precipitate during autoclaving and the consistency of results is very poor; the inconsistency depends both on the type of soil extract employed and the length and temperature of autoclaving.

In 1951 several attempts were made to improve this medium; these resulted in the formulation of ASW III (table 3) which is in effect Erd-SCHREIBER enriched with manganese, iron, glutamic acid, glycine, a mixture of known B-vitamins, and liver extract. This is the most successful formula of a series of all-purpose media rich in favourable substances yet non-toxic and of reliable performance. Both the organic and the inorganic enrichments were added with the intention of equating differences in activity of soil extracts of various origin. Manganese was added because HARVEY's (1947) results point to the possibility of encountering marine organisms with a high requirement for Mn like his *Dunaliella tertiolecta*¹. Glycine and glutamic acid are two carbon sources utilized by many fresh-water algae (HUTNER and PROVASOLI, 1951), and their addition in relatively high concentrations was intended to serve also as metal chelating and stabilizing agents. The vitamin mixture and the liver extract were added as a source of the known and possibly unknown water-soluble vitamins.

¹ Referred to by HARVEY (1947) as *Chlamydomonas*.

This formula proved very valuable for the isolation of *Amphora perpusilla* and *Gomphonema parvulum* and has since proved useful for maintaining a number of species. On re-examining the medium in the light of knowledge of the needs and tolerance of several marine algae, it would appear that the concentrations of amino acids and vitamins are near to

Table 3. Sea water organic enrichments (Haskins Laboratories and Millport

	ASW III	STP	E 3	E 13	E 6
Sea water	100 ml.	80 ml.	50 ml. ¹	75 ml ¹	50 ml. ¹
Distilled water	—	15 ml.	50 ml.	25 ml.	50 ml.
Soil extract	4 ml.	5 ml.	0.5 ml. ²	0.25 ml. ²	0.25 ml. ²
KNO ₃	20 mg.	20 mg.	10 mg.	5 mg.	5 mg.
K ₂ HPO ₄	2 mg.	1.0 mg.	1.0 mg.	0.5 mg.	0.5 mg.
Mn (as Cl ⁻)	0.04 mg.	—	—	—	—
Fe (as Cl ⁻)	0.01 mg.	—	—	—	—
NaH glutamate	50 mg.	50 mg.	—	—	—
Glycine	50 mg.	10 mg.	—	—	—
D, L-alanine	—	10 mg.	—	—	—
Vitamins 8 ³	0.1 ml.	0.1 ml.	—	—	—
Liver 1 : 20 ⁴	1.0 mg.	—	—	—	—
Liver (OXO L25)	—	—	—	—	25 mg.
Trypticase	—	20 mg.	—	—	—
Bacto Tryptone	—	—	—	—	25 mg.
Yeast autolysate	—	20 mg.	—	—	—
Sucrose	—	100 mg.	—	—	—
Glucose	—	—	—	—	25 mg.
pH	7.5	7.5—7.6			

¹ Autoclaved apart from the nutrients.

² Of a concentrated extract (see p. 411).

³ See note ¹ Table 4.

⁴ Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, U.S.A.

the high limit of tolerance, but the presence of these enrichments makes it also a very useful sterility test medium, especially if made in a semi-solid consistency by the addition of 0.3% agar.

The effect of concentration is even more evident with another sterility test medium STP shown in table 3. It is more complete and more concentrated than ASW III and stimulates luxuriant growth of marine bacteria but it is less favourable to the majority of algae, though *Prymnesium parvum*, *Monochrysis lutheri*, *Syracospaera carterae* and a *Coccolithophora* do well in it. These results were fully explained when, in attempts to speed up growth, it was found that, even in bacteria-free culture, various peptones (tryptic digest of muscle, blood, casein, soya bean, etc.), yeast extract, liver extract, and other organic substances were inhibitory at 5—50 mg.% and become toxic above these values. A mixture of B-vitamins of suitable strength for protists such as *Herpetomonas* (COWPERTHWAITE, WEBER, PACKER and HUTNER, 1953),

Tetrahymena, soil amoebae (HUTNER, unpublished) and *Peranema* (STORM and HUTNER, 1953) is too concentrated for more sensitive planktonic fresh-water and marine organisms. Riboflavin stands out for its toxicity at 0.01 mg. %. On the other hand, there is some evidence of antagonistic (detoxifying) action between vitamins, for, while dissecting the diluted and now innocuous mixture to determine its active components, we found some of the component vitamins still toxic in these concentrations if used singly.

STP besides being employed as a sterility test medium has been used advantageously as an aseptic enriching addition (0.5, 1.0, 2.0 ml./10 ml. of medium) to mineral media when isolating in bacteria-free culture organisms suspected of having complex organic requirements.

Early experiments on the replacement of sea water by chemically defined media were full of difficulties; media such as that formulated for *Phaeodactylum tricornutum* (*Nitzschia closterium* forma *minutissima*) (HUTNER, 1948) did not support the growth of *Gyrodinium* nor *Amphora*, probably because they are high in phosphates and citrate and low in calcium and magnesium.

The LEVRING solution had the same defects as sea water, the easy formation of precipitates during sterilization and the inconsistency of results. The addition after sterilization of sodium bicarbonate to bring the pH back to the right zone complicated matters.

For a fresh start we tried various possibilities to construct a non-precipitating yet adequate medium of general use for marine organisms. This goal was sought by the following means:

- a) metal-buffering by the addition of metal chelators to create a non-toxic reservoir of trace metals;
- b) pH buffering;
- c) determination of the lowest pH compatible with growth;
- d) reduction of the general salinity of the medium;
- e) determination of the lowest optimal concentration of Mg and Ca and their optimal ratio;
- f) investigation into the use of glycerophosphoric acid as a source of phosphorus. The salts of this acid are quite soluble;
- g) introduction of other weak solubilizers, i. e. acids having highly soluble salts, such as lactic and tartaric acids;
- h) determination of the lowest optimal concentration of phosphates.

Our first efforts were applied to *Gyrodinium californicum*. The quantities of Ca, Mg, and phosphates, the obvious causes of precipitates, were reduced as much as possible and 10 mg. % of ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA), a metal chelator and solubilizer, were added to

avoid further precipitation. Addition of EDTA necessitated the study of the needs for trace metals and, when a first adequate level of EDTA-trace metals + soil extract was found, we could investigate the lowest levels of Ca, Mg and K compatible with growth and formulate a less precipitable medium. The elimination of soil extract was made possible by adding to the mineral base a mixture of amino-acids and known vitamins and by raising the concentration of the trace metal mixture and, later, by finding a new metal level for a higher percentage of EDTA (20 mg. %). The work of 'tailoring' a medium for *Gyrodinium* was extremely protracted because optimal growth of this organism was reached only after a month or more and because we had of necessity to control an extensive list of variables.

The resultant medium (PROVASOLI and HOWELL, 1952; PROVASOLI and PINTNER, 1953) still formed occasionally small amounts of precipitate and did not always allow consistent growth; it did however permit an analysis of the vitamin requirements (PROVASOLI and PINTNER, 1953). Maximal growth, when a large liquid-air surface is provided, is 30—50,000 cells of *Gyrodinium* per ml. This medium, however, would not support the growth of the other marine organisms which were growing in Erd-SCHREIBER or ASW III.

The attempts to find an artificial sea water suitable for many algae continued along two convergent lines: (a) the study of the mineral nutrition of single marine species as test organisms, in the hope of finding common requirements or some guiding principles for formulating a common medium; (b) the gradual simplification of sea water-like solutions. Progress along either line was applied towards the advancement of the other.

An extremely important finding in the early and slow study of the nutrition of *Gyrodinium californicum*, a colourless flagellate, and *Amphora perpusilla* (HUTNER and PROVASOLI, 1953) was that for each of them soil extract could be replaced by a mixture of vitamins and trace elements. This opened the way to the discovery of the extent to which auxotrophy is common in algae (PROVASOLI and PINTNER, 1953; LEWIN, R. A., 1954; DROOP, 1954b, 1955a, 1955b; SWEENEY, 1954): chrysomonads, cryptomonads, dinoflagellates, and diatoms frequently needed vitamins. LWOFF and DÜSI (1938) were the first to find auxotrophy in algae in the form of a need for thiamine (or for its thiazole or pyrimidine moieties) of a few colourless flagellates (*Polytoma*, *Polytomella*, and *Chilomonas*). Ten years later B₁₂ (HUTNER *et al.* 1949) was found to be a growth factor for *Euglena gracilis* var. *bacillaris* and soon after many new algae were isolated belonging to phyla not yet explored nutritionally, most of them proving auxotrophic. Auxotrophy is present in organisms of every algal group and of all ecological environments. B₁₂ and thiamine are the

most commonly required vitamins; others are required by certain forms.

With this knowledge, we tried again other variations of the LEVRING solution, one of them, ASP (table 4), proved quite useful and served in general, when suitably diluted, to isolate in bacteria-free culture some brackish dinoflagellates: *Peridinium balticum*, *P. chattoni*, and *Exuviaella cassubica*. The major elements, compounded according to LEVRING's formula, were enriched with a new trace metal mixture, vitamin B₁₂, and a mixture of known B-vitamins.

We modified LEVRING's trace metal solution which employed values found optimal by A. KYLIN, with iron increased 3-fold and cobalt added. We based our calculations on the values given by LEVRING for anhydrous salts (PETERS 1948 referring to the LEVRING formula employed the same values but for hydrated salts). The trace metals were compounded in a stock solution such that 1 ml. of it added to 100 ml. of medium gave the desired values. The other important modification was the addition of EDTA acid in a concentration about 2—3 times larger than the one necessary to form a 1:1 chelate with the trace metals of the mixture. The final concentration of EDTA in the medium is 1 mg. % an extremely small quantity in comparison with the 10—20 mg. % employed in the *Gyrodinium* medium. Yet this quantity is enough to bind the trace metal carried in with the large quantities of "pure" chemicals employed in marine media. With this quantity of chelator, the omission of sodium bicarbonate, and the lowering of the pH to 7.4—7.6, the precipitate was reduced to almost nothing.

Different proportions of EDTA are not as useful: the quantity for a 1:1 chelate causes larger precipitates in the medium and the chelation above the 3:1 ratio often gives metal deficiencies. This metal-mix (P1) became very useful and, in employing it widely, we found that it could be added without harm even at high concentrations, i. e. 20 ml./100 ml. Its lack of toxicity pointed to a happy selection with balanced ratios of trace metals and chelator, making the whole a satisfactory metal buffer which could be employed at different levels: the best value for most species was later found to be 3 ml./100 ml.

Through evaluating the action of this mixture we at last understand some of the difficulties met when we were using higher concentrations of EDTA in marine media. At pH's above 8.0 EDTA actively binds calcium and magnesium and, in some conditions attendant upon sterilization, probably forms double Ca or Mg salts less soluble than Na-Ca-EDTA salts. Adding therefore more chelator to marine media is not an advantage and the difficulty can be overcome only by employing quantities far above the nutritional need of elements which are, like Co, Cu and Zn, more avidly chelated and therefore able to displace most of Ca and Mg from the EDTA chelates (see also Discussion). In other words,

we had created a difficulty which we had of necessity to resolve in a manner which, while offering no physiological advantage, had the drawback of introducing such levels of metals as to be toxic to many species.

The ASP medium, appropriately enriched, will support the growth of *Gyrodinium californicum*, a *Platymonas*, *Syracosphaera carterae*, the aforementioned colourless flagellate and bacterized cultures of *Gymnodinium splendens*. Cultivating a few species in a common medium was a most encouraging achievement. But the major elements of the base, made to imitate a simplified sea water, were still prone to cause precipitates. The real achievement had been the discovery of a method of adding trace metals in a non-toxic way for several species.

Another way to avoid precipitates is to lower the pH; originally we had started with media at pH 8.0—8.2 to simulate the pH of sea water, and our first experiments with *Gyrodinium* were aimed at finding the right conditions for lowering the pH. Later this study was extended to *Amphora*, to the colourless flagellate, and to *Syracosphaera*, and it was found that some marine organisms can be grown at pH 7.2—7.6 with certain balances of trace metals and chelator; chelation intensity varies with pH. The P1 metal mix has the advantage of being perfectly suitable for this pH range; some species however, as will be seen later, need an increased chelation for full growth.

Meanwhile we were searching for a good buffer for the zone 7.0—8.0. It was evident that we could not employ phosphates because they become rapidly toxic at concentrations far below those needed for buffering; moreover, phosphates form abundant precipitates. At first, we tried triethanolamine and tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS), with the colourless flagellate. For this organism both triethanolamine and TRIS were adequate but TRIS became inhibitory at about 0.3%. Subsequently *Rhodomonas* was found not to be inhibited by 1.0% TRIS (the maximum tried), while *Gyrodinium* was inhibited by triethanolamine: the dinoflagellates are in general more sensitive to amines. We are now employing TRIS routinely as the pH buffer for marine organisms, the 0.1% level not being toxic for any of the organisms tried. It buffers well between pH 7.5 and 8.5 and at 0.4% successfully holds the pH constant while a 4% CO₂ mixture in air is bubbled through the medium.

TRIS, however, like other amines, is mildly antibacterial owing to its tendency to antagonize potassium (MACLEOD and ONOFREY, 1954). This antagonism can be shown well with *Phormidium persicinum* (PINTNER and PROVASOLI, unpublished); in the absence of TRIS, the K requirement is already satisfied at 0.5 mg. % (the minimal quantity tried); the addition of 100 mg. % TRIS raises to 4—5 mg. %, the amount of K needed for full growth. The use of TRIS in our marine media at

the level of 0.1% is quite safe because we add a large quantity of KCl (50—60 mg. %); the abundance of Ca and Mg in sea water media helps to increase the margin of safety in using TRIS.

It was the application of these findings, the use of the P1 metal mix and TRIS, that permitted the construction of a synthetic mineral base for *Rhodomonas lens* (table 4, RC); the other important factors were the Ca/Mg ratio and the total concentrations needed by this organism. Ca and Mg are widely interchangeable so long as each element is present in a minimal quantity; equally good growth can be obtained with 8 mg. of Ca and 40 mg. of Mg or with 4—6 mg. Ca and 70 mg. of Mg; only 1 or 2 mg. of Ca are needed with Mg 100 mg. %. Similar results were obtained with *Phormidium persicinum*, which also seems to need very little calcium when magnesium is present in very high concentrations. It might be noted now that a small variation in Ca is reflected in a far larger one in Mg; this fact had escaped us previously and might have been one of the causes for poor growth in the old media. These experiments pointed to the possibility of growing marine organisms at concentrations of Ca and Mg entirely different from sea water; it was an invitation to inquire a little more extensively into the ability of marine and brackish organisms to grow at different salinities and at different monovalent/divalent ion and Ca/Mg ratios. Obviously non-precipitating media can be formulated more easily if one can replace the bulk of the divalent salts with the more soluble monovalent salts and reduce the overall salinity.

Experiments were set up to investigate the behaviour toward total salinity, Ca/Mg, and mono/divalent ion ratios of *Peridinium balticum* and *Exuviaella cassubica* as representatives of brackish water organisms and *Syracosphaera carterae* and *Rhodomonas lens* of the marine. Our results confirm BRAARUD's (1951) conclusions that most investigated marine and brackish organisms are euryhaline, being able to withstand wide variations in salinities and that salinities of 20—24 per thousand are often better than sea water. Even more encouraging was the flexibility shown toward the monovalent/divalent ratio: if the other conditions are right one can increase the monovalent ions to 6 and even 10 times the sea water ratio. In general Ca and Mg are both needed and, when both are present, they are widely interchangeable but the utilization of very different Ca/Mg ratios (from 24 : 1 to 1 : 24) seems to be dependent upon the salinity and mono/divalent ratios. The experiments, though too sketchy and based on too few species to permit more detailed conclusions, indicate the great physiological flexibility of the organisms in respect to certain parameters.

Simultaneously, the study of the nutritional requirements of *Amphora perpusilla* resulted in an artificial medium (DC in table 4) different from

the *Rhodomonas* conservation medium (RC). This medium is interesting in having high levels of glycerophosphate and lactate. These acids have the property of forming very soluble salts with Ca and heavy metals generally, and glycerophosphate, if utilized by the organism, serves as a most convenient and non-precipitating source of P and C. Glycerophosphate is utilized very well by *Phaeodactylum tricornutum* (*Nitzschia closterium* f. *minutissima*) (CHU 1946, b; HARVEY, 1953), by *Tabellaria flocculosa*, *Asterionella formosa*, and *Fragilaria capucina* (PROVASOLI and PINTNER, unpublished) and several purple bacteria (HUTNER, unpublished).

Calcium glycerophosphate is extremely soluble at room temperature but quite insoluble at high temperatures: therefore, to avoid precipitates during sterilization, glycerophosphate should be employed together with another acid whose chelated calcium salts are soluble, such as citric or nitrilotriacetic acids. Lactic acid, a weak chelator, has so far been found to be a good carbon source only for *Amphora*. As a rule of thumb, equal weights of glycerophosphoric and one of the other acids avoid precipitation. DC is an example of this combination; it does not precipitate and contains lactic acid.

The other alternative is the use of inorganic phosphorus (where glycerophosphate is not utilized). It is advisable to add it in minimal quantities even in the presence of the slight over-chelation introduced by the P1 mix. because precipitates are prone to form. Fortunately, very low concentrations suffice for most organisms: full growth is attained at 0.1—1.0 mg. % of phosphate. Furthermore, higher concentrations quickly become toxic, often at 10—20 mg. %. If more abundant growth is obtained by shaking and by bubbling CO₂ through, then P may become limiting and may have to be added intermittently. Another possibility is to add it as a known quantity of a poorly soluble salt of P such as Ca triphosphate. The concentration of 0.5 mg. % of phosphate is perfectly adequate for stagnant cultures and the possibility of precipitation is limited.

As a result of these convergent findings, new media like ASP 2 (table 4) were formulated to embody all the advantages of previous media: low salinity, high concentration of monovalent and low concentration of divalent ions; buffering with TRIS at 100 mg. % — a value low enough to avoid toxicity from competition with K yet high enough to ensure a good buffering action; addition of the P1 metal mix at 3 ml./100 ml.— a relatively large and non-toxic reservoir of trace metals; pH 7.4—7.6 to minimize formation of precipitates during sterilization; and a low concentration of phosphate. A Mg/Ca ratio of 5 was selected because this value serves for *Rhodomonas*, *Phormidium* and *Amphora*; we selected a relatively high value of Ca (10 mg. %) because a low level of Ca seems to

Table 4. Selected synthetic marine media (Haskins Laboratories)

	ASP	RC	DC	ASP 2	ASP 6
NaCl	2.4 g.	2.1 g.	1.8 g.	1.8 g.	2.4 g.
MgSO ₄ · 7 H ₂ O .	0.6 g.	—	0.5 g.	0.5 g.	0.8 g.
MgCl ₂ · 6 H ₂ O .	0.45 g.	0.5 g.	—	—	—
KCl	0.06 g.	0.06 g.	0.06 g.	0.06 g.	0.07 g.
Ca (as Cl ⁻) . .	40 mg.	7 mg.	10 mg.	10 mg.	15 mg.
Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O	—	0.3 g.	—	—	—
NaNO ₃	—	—	50 mg.	5 mg.	30 mg.
KNO ₃	10 mg.	10 mg.	—	—	—
K ₂ HPO ₄	2 mg.	1 mg.	—	0.5 mg.	—
K ₂ glycero-phosphate . .	—	—	40 mg.	—	10 mg.
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	2.5 mg.	—	20 mg.	15 mg.	7 mg.
"TRIS"	—	0.5 g.	0.5 g.	0.1 g.	0.1 g.
Thiamine	—	0.1 mg.	—	—	—
Biotin	—	0.05 µg.	—	—	—
B ₁₂	0.02 µg.	0.1 µg.	0.3 µg.	0.2 µg.	0.05 µg.
Vitamin Mix 8 ¹	0.05 ml.	0.02 ml.	0.1 ml.	—	0.1 ml.
Vitamin Mix S3 ²	—	—	—	1.0 ml.	—
Na taurocholate	—	0.3 mg.	—	—	—
Na lactate	—	—	0.05 g.	—	—
Na acetate · 3 H ₂ O	—	0.02 g.	0.05 g.	—	—
Na H glutamate	—	0.05 g.	0.05 g.	—	—
D,L-glycine	—	—	0.05 g.	—	—
Sucrose	—	0.07 g.	0.05 g.	—	—
Na ₂ EDTA	1.0 mg.	1.0 mg.	3.0 mg.	3.0 mg.	—
Na ₃ Versenol . . .	—	—	—	—	3.0 mg.
Fe (as Cl ⁻) . . .	0.01 mg.	0.01 mg.	0.08 mg.	0.08 mg.	0.2 mg.
Zn (as Cl ⁻) . . .	5.0 µg.	5.0 µg.	15.0 µg.	15.0 µg.	0.05 mg.
Mn (as Cl ⁻) . . .	0.04 mg.	0.04 mg.	0.12 mg.	0.12 mg.	0.1 mg.
Co (as Cl ⁻) . . .	0.1 µg.	0.1 µg.	0.3 µg.	0.3 µg.	1.0 µg.
Cu (as Cl ⁻) . . .	0.04 µg.	0.04 µg.	0.12 µg.	0.12 µg.	2.0 µg.
B (as H ₃ BO ₃) . .	0.2 mg.	0.2 mg.	0.6 mg.	0.6 mg.	0.2 mg.
"1S" Metals ³ . .	—	1.0 ml.	—	—	—
Mo (as Na Salt) .	—	—	—	—	0.05 mg.
H ₂ O	100 ml.				
pH	7.6	7.2—7.4	7.6—8.0	7.6—7.8	7.4—7.6

¹ 1 ml. of Vitamin Mix 8 contains: thiamine · HCl, 0.2 mg.; nicotinic acid, 0.1 mg.; putrescine · 2 HCl, 0.04 mg.; Ca pantothenate, 0.1 mg.; riboflavin, 5.0 µg.; pyridoxine · 2 HCl, 0.04 mg.; pyridoxamine · 2 HCl, 0.02 mg.; *p*-aminobenzoic acid 0.01 mg.; biotin, 0.5 µg.; choline · H₂ citrate, 0.5 mg.; inositol, 1.0 mg.; thymine, 0.8 mg.; orotic acid, 0.26 mg.; B₁₂, 0.05 µg.; folic acid, 0.2 µg.; folic acid, 2.5 µg.

² 1 ml. of vitamin Mix S3 contains: Thiamine · HCl, 0.05 mg.; nicotinic acid, 0.01 mg.; Ca pantothenate, 0.01 mg.; *p*-aminobenzoic acid, 1.0 µg.; biotin, 0.1 µg.; inositol, 0.5 mg.; folic acid, 0.2 µg.; thymine, 0.3 mg.

³ 1 ml. of "1S" metals contains; Sr, 1.3 mg.; Al, 0.05 mg.; Rb, 0.02 mg.; Li, 0.01 mg.; I, 0.005 mg.; Br, 6.5 mg.

sub. itute for a greater quantity by weight of Mg and because it was noted that the minimal quantity of Ca needed for 50 mg. % of Mg varies from species to species (from 3 to 10 mg. %).

The ASP 2 medium was designed to serve both for bacterized and pure cultures of photosynthetic marine algae; the values of nitrate and phosphate are kept low to suppress excessive bacterial growth and if needed they can be reduced even further to simulate the conditions found in nature. No carbon sources were added because most of the photosynthetic marine algae so far isolated seem to be strict phototrophs; only *Amphora perpusilla*, *Prymnesium parvum* and *Monochrysis lutheri* have thus far been shown to utilize preformed organic carbon sources.

The addition of vitamins was restricted to those most likely to be needed: B_{12} seems to be the most prominent; thiamine and biotin are seldom needed. The other vitamins included in the S 3 mixture were added as a precaution; this mixture proved to be less toxic than the more complete vitamin mix normally employed at the Haskins Laboratories (COWPERTHWAITE *et al.* 1953, p. 974). The ASP 2 medium, because of its low content in N and P, and its lack of carbon sources, does not favour bacterial growth, and it can be made to favour the preferential growth of algae even more by lowering the temperature to 10—15° C and by using the optimal light intensity for the algal species. Intense light is often needed but there are species, e. g. *Phormidium persicinum*, which are inhibited by more than 300 ft. candles (PROVASOLI and PINTNER, 1954). By keeping the bacteria to a minimum, bacterized cultures can be further improved by modifying the mineral base and purification procedures can be started with more chance of success. The silicate is generally added only when culturing diatoms; if it is added, to avoid precipitation, the pH should be lowered to 7.2 after the addition of silicate and before adding the phosphate.

ASP 2 is only one of the typical media employed for culturing marine algae. It allows some growth of several diatoms, chrysomonads, cryptomonads, dinoflagellates, blue-green algae and chlorophytes and is a very good medium for *Phormidium persicinum*, *Gyrodinium californicum* and two other species of *Gyrodinium*, *Amphidinium klebsii*, *Prymnesium parvum*, *Rhodomonas lens*, *Stephanopyxis turris* and *Pilinia*. It has been found, however, that some organisms may need more trace metals or more metal chelators or both. The following experimental procedure often proved successful:

a) keeping constant the ASP 2 basal medium, add nitrilotriacetic acid (NTA), (a weaker metal chelator whose Ca and Mg salts are more soluble) in different quantities: 2, 4, 6, 8, and 10 mg. per 100 ml. of medium

(dissolve the NTA in a dilute solution of NaOH and bring to the final pH of 7.5).

b) modify the ASP 2 base by adding the P1 metal mixture at different levels: 1, 3, 10 or 20 ml. per 100 ml. of medium.

c) vary simultaneously the quantities of NTA and P1 metals.

ASP 2 + 10 mg. % of NTA is a very good medium for *Eutreptia* sp., *Gymnodinium splendens*, *Isochrysis galbana*, *Syracosphaera elongata*, *Monochrysis lutheri*, and *Exuviaella cassubica* (medium diluted 1/3). Some species seem to prefer richer media: *Prorocentrum micans* and an *Eutreptia* grow better in RC and *Hemiselmis virescens* prefers media rich in amino-acids like S 46. The amino-acids can be beneficial as metal chelators, as carbon or nitrogen sources, and pH buffers, and, in general are very useful when the mineral part of the base is not well balanced. The need in the case of *Hemiselmis* however is a specific one; one of us (M. R. D) finds that glycine is the best N source; apparently amino nitrogen is needed. Other substances that often seem to help growth are alanine, glutamic acid, asparagine, uric acid, guanine, guanylic acid, and thymine, though their need is not absolute or specific.

Another medium, ASP 6, (table 4) proved useful: it has a higher salinity, and makes easier the direct transfer from sea water of osmotically sensitive species. The increased salinity was obtained by raising proportionally the quantity of Na, K, Mg, and Ca of ASP 2. The metal mix is an entirely new one, more concentrated in trace metals and adjusted to Versenol (Na₃ hydroxyethylethylenediamine triacetate). Versenol has the advantage of forming metal chelates which do not hydrolyze easily at high pH, thus avoiding precipitates at pH 8.0—8.4. The raising to pH 8.4 would be beneficial because at this pH CO₂ is avidly absorbed and forms a reservoir of bicarbonate. This could be a means of providing increased CO₂ (which favours the growth of photoautotrophic algae) without having to employ bubbling or shaking — a difficulty when experimenting with the many variables to be considered in the study of nutritional requirements. Little work has been done yet with this metal mixture but ASP 6 is a good medium for *Syracosphaera elongata*, *Skeletonema costatum*, *Rhodomonas lens*, and *Amphidinium klebsii*.

Development of marine media at Millport

Identity of aims has naturally resulted in many problems and difficulties being common to the New York and Millport laboratories. Since we have discussed these in the previous section it will suffice in the present merely to annotate the Millport media given in the tables and to point out differences and similarities in our solution to the problems.

Modifications of the Erd-SCHREIBER medium have been used with success at Millport for the purpose of isolation and for conservation. In these solutions (e. g. E 3, E 13, E 6 in table 3) the hazards of precipitation are avoided by autoclaving fresh sea water apart from the nutrients and mixing them when cold. Autoclaving is kept down to a minimum: pressure is just brought to 15 lb. in a small pressure cooker. The soil extract recipe differs from others as it involves alkaline extraction, resulting in a very concentrated neutral extract which can be standardized by acid precipitation¹. E 3 formed the base of a series of media enriched further with various organic extracts and peptones, E 6 being a variant most widely and successfully used. E 6, is, in effect, PRINGSHEIM's (1946a) 'soil-extract and salts', PRINGSHEIM's (1952) 'Ochromonas' medium and natural sea water in the proportion 1 : 1 : 2 by volume, while E 3 is the first and last of these in equal proportions and E 13 in the proportion 1 : 3. Media of the E series were used in isolating in bacteria-free culture a number of supra-littoral, littoral and pelagic species (DROOP, 1954a, 1954b, 1955a, 1955b): *Monochrysis lutheri*, *Syracosphaera elongata*, *Prymnesium parvum*, *Mallomonas epithalattia*, *Microglena arenicola*, *Glenodinium foliaceum*, *Peridinium trochoideum*, *Hemiselmis virescens*, *Skeletonema costatum*, *Coscinoscira polychorda*, *Waerniella lucifuga*, and a number of Chlorophyceae. The presence of glucose, tryptone and liver extract in E 6 renders it very suitable for sterility testing. It has also been used for making minute aseptic enrichments (1—20 ml./100 ml.) to membrane filter-sterilized sea water. The recent tendency has been to decrease the quantity of organic enrichments, particularly for pelagic organisms.

Attempts at synthetic marine media at Millport have mostly been based on a sea water substitute (DROOP 1955a: SW 1) inherited from the Culture Collection of Algae and Protozoa, Cambridge, and which is PRINGSHEIM's (1946a) formula with magnesium sulphate omitted. Calcium is added as sulphate and the mixture differs from sea water in being low in Mg, Ca, and sulphate. In the media (e. g. table 5, S 22, S 32 etc.) this mixture is generally attenuated 4 times to give a salinity of 16‰. The solution then has 11.6 mg. % Ca, about a quarter of the amount present in sea water.

Experiments, rather similar to those referred to on p. 406, to determine the optimum concentrations of Na, Mg and Ca indicated values of 3—6, 12 and 12—24‰. salinity respectively for *Monochrysis*, *Phaeodactylum*, and *Skeletonema* and Ca optima of 1.5—3, 1—10, and 10 to 20 mg. % respectively. Unlike Ca, Mg could be varied within very wide

¹ Two parts by volume of water to one of soil with 2—3 g. NaOH per l. of water steamed for two hours gives a neutral extract yielding 5 to 6 g. of acid precipitable humic substance per l. of extract. The extract is filtered clear.

limits (0.1—100 mg. %) particularly when Ca was optimal. There was no indication that Ca was replaceable by Mg in these experiments, in which respect they differ from the New York experiments.

SW 1 would seem, therefore, to present a fairly good compromise, though, of course, one could hardly expect to meet the requirements of every organism with a single solution.

More exact imitations of natural sea water have been used instead of SW 1 in some of the media (e. g. U 22, U 32, U 36 etc.) but without any general advantage. Their use is limited to instances when a more naturalistic artificial sea water is desired for reasons other than the requirements of the alga. The low salinity medium V 37 was designed for *Monochrysis*, on the results of the experiments referred to above, and has been used for *Mallomonas epithalattia* and other supra-littoral species.

With the mixture of major elements has been added a rather arbitrary mixture of minor elements down to lithium, but with boron and fluorine omitted (table 5; SW 2 in Droop, 1955a) but there is no evidence to suggest that any of them is generally essential.

Attempts at heavy metal control were at first directed towards finding a mineral substitute for soil extract for the freshwater non-auxotrophic *Haematococcus pluvialis*. Presentation of iron was the main problem. RODHE's (1948) citric acid-iron citrate mixture was not efficient in the alkaline media necessary for the cultivation of this organism. The first successful defined media contained an unusually high addition (1—10 mg. %) of iron citrate which functioned as a reservoir after being hydrolyzed and precipitated by autoclaving. Later, iron citrate was replaced by smaller amounts (0.01—0.1 mg. %) of an iron chelate of EDTA¹, with even better results. Manganese and calcium were the only other trace metals added.

HUTNER and PROVASOLI's early formula of an EDTA chelated metal mixture (HUTNER and PROVASOLI, 1951) was very much too concentrated for either *H. pluvialis* or the majority of the euryhaline organisms in culture at Millport. However, when copper and cobalt were omitted the mixture was satisfactory when the heavy metals and EDTA were presented at 1/25 of the concentration suggested. Finally, following PROVASOLI and PINTNER (1953) the re-introduction of small amounts of copper and cobalt led to the metal mixture TM 2 (table 8; DROOP, 1955a) which has since been used extensively in both fresh water and marine media at Millport. The original mixture has survived several attempts of improvement by increasing or decreasing the chelate ratio. TM 2 is very similar to the PI mixture of the Haskins Laboratories as regards

¹ FeCl₃ precipitated from solution with NaOH, washed, and dissolved to saturation in a known solution of Na₂ EDTA.

overall concentration, but the high Zn concentration causes the chelate ratio to be as low as 6 : 5. TM 2 stock solution is prepared at one hundred-fold the concentration at which it is used in the media; if prepared with sulphates it does not throw a precipitate on standing.

The three mineral solutions, SW 1, SW 2, and TM 2, described above constitute the base of all the synthetic media in routine use at Millport (Series S media). With appropriate defined enrichments (tables 5, 9) they have allowed very heavy bacteria-free cultures of *Monochrysis lutheri*, *Prymnesium parvum*, *Syracosphaera elongata*, *Isochrysis galbana*, *Hemiselmis virescens*, *Nannochloris oculata*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum* and have been used to maintain *Prorocentrum micans*, *Oxyrrhis marina*, *Microglena arenicola*, *Mallomonas epithalattia*, *Waerniella lucifuga* and *Ectocarpus parasitica*.

The useful pH range of culture media prepared from these solutions has been found to be from 8.8 (for *Hemiselmis virescens*) to 7.2; and throughout this range precipitates do not form with SW 1 even at double the normal strength (salinity 32‰) when the solutions are autoclaved with 1 mg. % K₂HPO₄. It should be noted, however, that the methods of avoiding precipitates differ from those in use at the Haskins Laboratories. It has been the practice at Millport to autoclave all solutions as lightly as is consistent with efficiency. Opinions differ as to what the minimum permissible pressure and time are, but at Millport we have found that contamination never occurs in media autoclaved in test tubes in a small pressure cooker (capacity 5 litres) when the pressure is brought up to 15 lb./in² and left there for no longer than one minute (in contrast to 15 lb. for 20 mins.). With light autoclaving such as this the problems of precipitation are much less and the latitude in permissible formulae consequently greater. This practice also obviates having to lower pH merely in order to avoid precipitates, a consideration of some importance when an ecological pH is demanded.

In the course of investigations into the nutrition of chrysomonads it was found that soil and liver extracts were not always completely replaceable by known B vitamins and the mineral solutions described above. There frequently remained a residual beneficial effect derived from the addition of various natural substances which did not seem at all specific. Sometimes mixtures of amino- and aliphatic-acids and purines could complete the replacement and one had the impression that all that was needed was to make the medium as complex as possible. It was eventually realized that the effect of these substances was more often physical than nutritional and that pH buffering was chiefly concerned. The first buffered media to be used at Millport contained a glycine-guanine-uric acid mixture (S 22) which was adequate for *Nannochloris*, *Hemiselmis* and the chrysomonads: but, following the practice of the

Table 5. Selected synthetic marine media (Millport)

1) Sea Water Substitutes

Serial letter of medium	S (SW 1 attenuated $\times 4$)	T	U	V
NaCl	1.5 g.	1.23 g.	2.45 g.	0.5 g.
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0.25 g.	0.49 g.	0.98 g.	0.075 g.
KCl	0.04 g.	—	—	—
Ca (as Cl ⁻) . .	—	0.02 g.	0.04 g.	0.0024 g.
Ca (as SO ₄ ⁼) .	0.012 g.	—	—	—
Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O	—	0.36 g.	0.73 g.	—
K ₂ SO ₄	—	0.043 g.	0.085 g.	0.013 g.

2) Minor Elements (SW2 attenuated $\times 200$) common to all media3) Trace Metals (TM2 attenuated $\times 100$) common to all media

Br (as K ⁺)	2.2 mg.	Na ₂ EDTA	2.0 mg.
Sr (as Cl ⁻)	0.38 mg.	Fe (as EDTA) ¹	0.01 mg.
Al (as Cl ⁻)	0.0028 mg.	Zn (as SO ₄ ⁼)	0.23 mg.
Rb (as Cl ⁻)	0.0061 mg.	Mn (as SO ₄ ⁼)	0.065 mg.
Li (as Cl ⁻)	0.0006 mg.	Mo (as NaMoO ₄)	0.02 mg.
I (as K ⁺)	0.002 mg.	Co (as SO ₄ ⁼)	0.00063 mg.
		Cu (as SO ₄ ⁼)	0.00013 mg.

4) Enrichments

Serial Number of medium	22	32	36	37	46
TRIS	—	50 mg.	50 mg.	50 mg.	50 mg.
KNO ₃	10 mg.				
K ₂ HPO ₄	1.0 mg.				
Thiamine	0.1 mg.				
B ₁₂	10 μg.				
Glycine	4.0 mg.	—	—	4.0 mg.	30 mg.
Glutamic acid	—	—	—	—	30 mg.
Asparagine	—	—	—	—	30 mg.
Guanine	4.0 mg.	—	—	1.0 mg.	—
Uric acid	0.4 mg.	—	—	0.4 mg.	—
Glucose	—	—	—	—	30 mg.
Na acetate (anhyd.)	—	—	—	—	30 mg.
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	—	—	10 mg.	—	—

Quantities given are amounts per 100 ml. of medium (prepared with glass distilled water). The sea water substitutes, Minor Elements and Trace Metals are conveniently dispensed from concentrated stock solutions. (e. g. The Sea Water Substitute of Series S media is the solution referred to on p. 411 as SW1 attenuated 4 times, the chelated Trace Metals those of solution TM2 attenuated 100 times, and the Minor Elements solution SW2 attenuated 200 times.) pH is adjusted with HCl or NaOH as required.

¹ The sulphate or chloride may be used.

Haskins Laboratories, it has since been replaced by the more efficient TRIS (in S 32, S 36 etc.). Uric acid and guanine had originally been included among the organics in our defined media because the species then being studied came from a habitat often rich in uric acid and related compounds in the form of gull excrement (DROOP, 1953). TRIS enabled *Skeletonema* to be cultured in a defined medium, S 36 (DROOP, 1955b).

S 36 is equivalent to the Haskins ASP 2 medium in both composition and application. Since nutritional studies have indicated a frequent requirement for thiamine and B₁₂, table 5 has included only versions of the media containing these vitamins. Mixtures of B vitamins of which there are numerous examples in the literature (and two at the base of table 4) can be usefully added to these media during the early stages of nutritional investigations. Medium S 46 was designed to meet the high glycine requirement of *Hemiselmis virescens* and was further enriched to make it more generally useful for species preferring a high organic content; it is very similar to medium DC of the Haskins Laboratories, and is used to maintain *Prymnesium parvum*. S 37 is, however a more generally useful medium as it allows adequate growth of the species preferring S 46 and also of those, like *Monochrysis lutheri* and *Syracosphaera elongata*, which give heaviest growth in relatively poor media such as S 32.

Discussion

We have described how several similar media have been developed independently in New York and at Millport. Another marine medium, developed by VISHNIAC (1955a, 1955b) for *Labyrinthula* (table 6), is also a good all-purpose medium: besides supporting growth of three species of *Labyrinthula* it has been used for several marine fungi. It is, therefore, of interest to find that this fungal medium has points of similarity to our media for algae.

The ratio between Mg and Ca is extremely close to ours (6 : 1); the description of a wide interchangeability between the two ions and the ability of a little Ca to substitute for a larger quantity of Mg (VISHNIAC, 1955b) parallel almost exactly our observations on *Phormidium* and *Rhodomonas*. The only differences are the lower minimal requirement in Mg and Ca and the ability of one isolate of *Labyrinthula* to grow without added Ca and with very low Mg when the other ion is present in high quantities.

The interesting ecological situation of the Salton Sea formed by the irrigation drainage of the Imperial Valley, California, lends weight to data on flexibility of a number of organisms in respect to Ca/Mg ratios. The waters of the Colorado River which form the Salton Sea, through intense evaporation have reached salinities similar to sea water but,

Table 6. Other Synthetic marine media.

	HUNTER (1948) <i>Phaeodactylum</i>	HUNTER et al. (1950) <i>Dunaliella</i>	VISHNIAC & WATSON (1953) <i>Labryrinthula</i>	VISHNIAC (1955a, 1955b) marine fungi	PROVASOLI & PLINTNER (1953) <i>Gyrodinium</i>	LEWIN (1954) <i>Stichococcus</i>	LEWIN (1955) <i>Prasiola</i>	RYTHER (1954) <i>Nannochloris</i> , <i>Stichococcus</i>
NaCl	0.2 g.	0.25—4.0 g.	2.5 g.	2.5 g.	2.4 g.	2.3 g.	2.6 g.	2.67 g.
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	—	—	—	—	0.3 g.	1.1 g.	—	0.22 g.
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.25 g.	0.25 g.	0.5 g.	0.5 g.	30 mg.	—	—	0.32 g.
KCl	—	—	—	0.1 g.	30 mg.	—	—	73 mg.
Na ₂ SO ₄	—	—	—	—	—	—	—	—
NaHCO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—
KNO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	—	—	15 mg.	—	10 mg.	—	—	—
NH ₄ NO ₃	—	50 mg.	—	—	—	—	—	—
NH ₄ Cl	—	—	—	—	—	—	—	—
(NH ₄) ₂ CO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—
CaCO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—
CaCl ₂	—	—	—	—	—	—	—	—
K ₂ HPO ₄	—	40 mg.	20 mg.	25 mg.	20 mg.	—	—	—
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	—	—	—	10 mg.	—	—	—	—
KH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—	—	—
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	—	5.0 mg.	—	—	—	—	—	—
EDTA ₁	—	—	50 mg.	50 mg.	50 mg.	20 mg.	—	2.0 mg.
Na ₃ citrate· 2 H ₂ O	—	100 mg.	—	—	—	—	—	—
Fe	—	—	0.5 mg.	0.6 mg.	0.2 mg.	—	—	—
Mn	—	—	0.03 µg.	1.0 mg.	2.0 mg.	—	—	—
Mo	—	—	5.0 µg.	1.0 mg.	—	0.02 mg.	—	—
Zn	—	—	5.0 µg.	3.0 mg.	2.0 mg.	—	—	—
Co	—	—	—	—	0.02 mg.	—	—	—
Cu	—	—	5.0 µg.	—	—	—	—	—
B	—	—	0.05 mg.	0.5 mg.	0.002 mg.	—	—	—
KBr	—	—	—	4.0 mg.	0.02 mg.	—	—	—

because of their origin, have a different ionic composition. Compared with sea water (table 7) they are high in SO_4 , Ca and Na and lower in Mg and K: the Mg/Ca ratio is roughly 1 : 1, that of sea water 3 : 1.

During the last few years many artificial introductions of marine organisms have resulted in the establishment of a peculiar community in which the dominant species are the plankton-feeding fish, *Bardiella icistius*, a barnacle, *Balanus amphitrite*, an anellid, *Neanthes suecinea*, many marine phytoplanktonts, including *Exuviaella*, *Peridinium*, *Amphidinium*, *Gyrodinium*, many diatoms, and a blue-green alga (BOYD CARPELAN and WHITNEY, 1954). We have here a whole series of typically marine organisms belonging to both animal and plant kingdoms which are evidently able to tolerate ionic ratios of the major elements far removed from those of their normal habitat. The Salton Sea is instructive for the very reason that its evolution has not proceeded as far as that of, for instance, the Great Salt Lake or the Dead Sea, whose inhabitants are so specialized or tolerant as to be useless for purposes of comparison.

It is interesting to compare our trace metal solutions with those of VISHNIAC. In order to do this, in table 8 the P1 and TM 2 mixtures have been entered at, respectively, 50 and 30 times their normal concentration to bring the amounts of chelator up to the level used in VISHNIAC's media. The ratios between chelator and trace metals (by equivalents) are respectively 3 : 1 (P 1) 2 : 1 (VISHNIAC and *Gyrodinium*) and 1.2 : 1 (TM 2). The difference is caused mainly by the Zn content of the mixtures: in

Table 6 (Continued)

	K acetate 0.2 g., Gly- cine 0.25 g.	Gelatin hydro- l. 100 mg., PABA, folic, biotin, nicotinic, pan- tothenate, pyrid- oxine, pyrid- oxamine, B ₁₂ ,	1 S metals ⁴ 0.5 ml., NaH glutamate, lysine, leu- cine, B ₁₂	P ₁₂	Asparagine 100 mg.
Other additions				7.0	
pH				7.2—7.5	
Amounts are per 100 ml. of medium.					

¹ Ethylenediamine tetraacetic acid. ² Added in VISHNIAC 1955b for 3 isolates of *Labyrinthula*. ³ As citrate. ⁴ See note 3 table 4.

the P1 mixture the order of concentrations follows the MELLOR-MALEY series (MELLOR and MALEY, 1948), Zn being in its rightful place between Fe and Co. It is difficult to see what advantage is gained by the displacement of Zn in the other three mixtures; though possibly it has the effect that Mn and Fe are rather more loosely held and therefore more readily available while Co and Cu are not affected. In the case of TM 2 no obvious benefit was derived from reducing Zn. These mixtures are to a great

Table 7. Comparison of the ionic composition of Salton Sea and ocean water
(BOYD, CARPELAN and WHITNEY, 1954)

Ion	Ocean Water (Concentration per 1000)	Salton Sea Water (Concentration per 1000)
Cl ⁻	18.98	17.011
SO ₄ ⁼	2.65	7.45
HCO ₃ ⁻	0.14	0.17
Na ⁺	10.55	11.82
Mg ⁺⁺	1.27	0.99
Ca ⁺⁺	0.40	0.80
K ⁺	0.38	0.19
Total	34.37	38.43

Table 8. Comparison of chelated trace metal mixtures

	VISHNIAC (1955) (mg.)	P 1 concentrated ¹ 60 × (mg.)	TM 2 concentrated ¹ 30 × (mg.)	Gyrodinium concentrated ¹ 2.5 × (mg.)
EDTA	50	50	50	50
Zn	2	0.30	6.7	1.0
Mn	2	2.4	1.9	2.5
Fe	0.2	0.6	0.3	0.75
Co	0.02	0.006	0.02	0.0075
Cu	0.002	0.0024	0.004	0.00075
Mo	0.02	—	0.66	0.125

¹ Relative to concentration used in medium.

extent empirical (P1 is the most logical) and it is not easy to justify them theoretically. But it does appear that provided the MELLOR-MALEY order is adhered to, the most useful chelation ratio lies between 3 : 1 and 2 : 1. As might be expected, greater ratios lead to over-chelation and metal deficiencies while smaller ones cause precipitation. Some deviations from the MELLOR-MALEY order are tolerated, however, or may even be advantageous, if they alter slightly the permitted limits of the chelation ratio.

We have already remarked on the relative lack of toxicity of P1 and TM 2 toward most algae, some tolerated P1 up to 20 or even 40 ml./100 (i.e. 2/5 or 4/5 of VISHNIAC's concentrations). We have chosen

to employ for our media low values to avoid the addition of high quantities of chelator. VISHNIAC employs a large quantity of trace metals in her media, and it might well be that, in general, marine fungi withstand, or indeed, prefer higher concentrations of trace metals than algae. On the other hand P1 mixture (in ASP 2) permits growth of several marine ascomycetes and of *Halophiobolus* sp., *Ceriosporopsis* sp. and *Peritrichospora* sp., (S. MEYER, personal communication), and VISHNIAC's S 3 strain (probably an *Ectrogella*) also grows in an ASP 2 type of medium if glycerol and thiamine are added (VISHNIAC, 1955a).

It will now be apparent that all the more recent synthetic media discussed in this paper¹ are built according to a common plan which may be shortly stated:

- 1) An artificial sea water mixture of low salinity and low calcium content.
- 2) A chelated trace metal solution with a ratio of chelator to trace metals of not less than 1 : 1 and not more than 3 : 1, usually employed at great dilution.
- 3) A pH buffering system.
- 4) Inorganic macro-nutrients, and organic macro- and micro-nutrients as required.

The success of culture media built on this plan is by and large considerable. Indeed it appears that our knowledge now enables us to undertake with some confidence culture and nutritional studies on any photosynthetic littoral, supra-littoral or estuarine organism. There is no such confidence, however, where pelagic species are concerned. Whereas the chrysomonads probably do not present a nutritional obstacle to their pure culture and several have been cultured satisfactorily, not a single *Chrysochromulina* is represented. Pelagic members of other groups are limited to two or three dinoflagellates, a diatom or two and a single cryptomonad. No oceanic species has yet been obtained in pure culture.

In spite of the ubiquity and abundance of μ -flagellates, the bulk of phytoplankton is considered to be composed of centric diatoms, and to a lesser extent, at any rate in northern waters, of dinoflagellates. It is precisely with this class of organisms that least progress has been made and, although the fact may not be surprising, the exact reasons are not at all clear.

In the first place it can be assumed that further refinements of culture media along present lines, particularly as regards heavy-metal control, would extend the range of organism it is possible to culture axenically;

¹ The latter part of table 9 summarises the general characteristics and uses of these media.

but there may well be other quite unrelated factors of which we have no knowledge at present.

The oceans are of course a relatively constant environment in many respects. Considerably smaller variations in constitution, temperature and CO₂ content than are encountered in supra-littoral, littoral and estuarine waters are very likely reflected in narrower tolerances of oceanic organisms. With the exception of the micro-chemical constitution all these factors can be controlled in the laboratory, although very likely insufficient attention is normally given to avoiding temperature shock and like hazards during collection and initial manipulation of material destined for cultures.

Oceanic diatoms such as *Chaetoceros decipiens* have been maintained in unialgal culture with comparative ease but have defied all attempts to culture them free of bacteria—not, it should be emphasized, because they could not be freed from bacteria, which in the case of these diatoms is a simple thing to do, but because they tend not to thrive in our media upon isolation. This suggests, in the first place, requirements for micro-nutrients not supplied by the range of organic enrichments in the media, a possibility which should at all times be kept in mind. But it is possible to over-emphasise the role of micro-nutrients, and, although a mixed population of bacteria is likely to make available the whole gamut of growth factors, it also may have a pronounced stabilizing influence on the physical state of the medium; on, for instance, heavy metal solubility, buffering and poisoning of the medium.

Indeed, the work of HARVEY (1939), MATUDAIRA (1942) and J. C. LEWIN (1954) on the role of divalent sulphur in diatom nutrition does suggest the existence for diatoms of a critical oxidation-reduction potential. Hitherto little attention has been given to this aspect of culture technique in the algal field for the obvious reason that heavy algal cultures become oxygen-rich. Such conditions, however, do not necessarily prevail in recently transferred cultures which, on the contrary, may be very sensitive to the potential during the lag and early phases of growth. According to J. C. LEWIN (1954) reducing conditions are necessary for silicon utilization in washed cells of *Navicula pelliculosa*. Some recent unpublished experiments on *Skeletonema* by one of us (M. R. D.), however, point to the existence of a rather sharp optimum in this respect, for it has been extremely easy to poison the medium with as little as 0.3 mg. % sulphide or cysteine, unless the medium has been allowed to stand for some days before making the addition.

Factors such as these very likely contribute to the difficulty of establishing axenic cultures of pelagic and oceanic diatoms, and, although there is little as yet to suggest it, the same may be true of dinoflagellates.

Table 9. Summary of the development of marine media

a) Sea Water Media

Medium	Composition	Defects	Advantages	Use
ALLEN and NELSON "MIQUEL Sea Water"	Sea water and mineral enrichment	Precipitates — inconsistent results		Bacterized cultures of algae
FOYN "Erd-SCHREIBER"	Aged sea water + minerals + soil extract	Precipitates—reproducibility depends on type of aged sea water and soil extract	More reliable, richer in vitamins and trace metals	Bacterized cultures of more exacting algae
BARKER Medium	Same	Same	More reliable because of added trace metals & B_{12}	Pure cultures of dinoflagellates
SWEENEY Media	Aged sea water + minerals + Fe, Mn, + chelator + B_{12}	Precipitates—reproducibility depends on type of aged sea water	Less precipitate. Less dependent on age of sea water	Pure cultures of dinoflagellates
ASW III	Sea water + minerals + Fe, Mn + vitamins + liver extract + glutamate + glycine + soil extract	Precipitates — Some inconsistent results. Too concentrated?	Conservation medium for pure cultures of exacting species. Sterility test medium	Conservation medium for pure cultures of exacting species. Sterility test medium (<i>Skeletonema</i> conservation)
E 6	Fresh sea water + minerals + liver extract + tryptone + glucose + soil extract. Sea water autoclaved apart from nutrients	Too concentrated for some species, insufficient organics for others	No precipitate. Age of sea water immaterial	

b) Artificial Media

RYTHER . . .	Sea water-like basal medium	Precipitates — Lacks vitamins and trace metals	Bacteria-free cultures of two Volvocales
--------------	-----------------------------	--	--

Table 9 (Continued)

Medium	Composition	Defects	Advantages	Use
LEVRING . . .	Sea water-like basal medium + trace metals	Precipitates — Lacks vitamins	Less dependent on impurities of major elements as source of trace metals	Bacterized cultures of <i>Ulva</i> and <i>Enteromorpha</i>
ASP . . .	Sea water-like basal medium + 1 ml of chelator-trace metal mixture + vitamins + low pH	Still prone to precipitate because of its sea water-like basal medium	Introduction of a chelated mixture of trace metals-addition of vitamins + low pH	A few bacteria-free cultures of algae
RC . . .	A new mineral base with reduced Mg, Ca, K + pH buffer + organics + vitamins + chelator/trace metal mixture	Too much organic (?). Too much pH buffer	Addition of pH buffer — no precipitation due to lower Mg and Ca	Developed for <i>Rhodomonas lens</i> . Also good for a few other algae like <i>Proctenium</i>
DC . . .	Mineral base with reduced salinity and Mg/Ca ratio of 5 + high N, P, and organics. Higher level of chelator/trace metal mixture (3 ml /100) + vitamins	Too high organic for many species. Too much pH buffer	Higher chelated metal mix. No precipitation at high P concentration due to solubilizing action of glycerophosphate/lactate	
ASP 2 . . .	Low salinity mineral base + low pH buffer + Mg/Ca ratio of 5 + Ca 10 mg. % + high level chelator/trace metal mixture + low N and P + vitamins	Occasional precipitate	Embodies the favourable conditions for the largest number of marine algae	
ASP 2 NTA .	Same + 10 mg. % nitro-triactic acid	More chelation	Bacteria-free cultures of chrysomonads, cryptomonads, dinoflagellates, diatoms and blue green algae	More favourable for some algae than ASP 2

Table 9 (Continued)

ASP 6.	...	Same as ASP 2 but with a higher salinity though keeping the same ratio for Na, K, Mg, Ca + a different metal mixture and chelator	Same	A higher salinity might be necessary for some marine species, especially for isolation purposes	More favourable for some algae
S 22	...	Half strength sea water equivalent. Reduced Mg, Ca, SO ₄ . EDTA chelated trace metals. Some pH buffering. B ₁₂ and thiamine	Insufficient pH buffering. Some guanine precipitates	Some organics	Developed for chrysomonads, now mostly replaced by S 37
S 32	...	As S 22 but with more efficient pH buffering (TRIS)	Lacks organics	No precipitate. Efficient pH buffering	Chrysomonads
S 36	...	As S 32 with added silicon, B ₁₂ and thiamine but no organics	Lacks organics. Too much silicon? Possibly too low salinity for oceanic species	Same	Developed for <i>Skeletonema</i>
S 37	...	As S 32 with additional organics	As S 32 with additional organics	Some organics	Chrysomonad conservation medium
S 46	...	As S 32 with organics further increased	Organics too high for many species	High organics; can be used at pH as high as 8.8	Developed for <i>Hemiselmis</i> . Useful where high organics are needed
V 37	...	Low salinity (50/00) sea water substitute, otherwise as S 37	Too low in salinity for most marine species	Low calcium	Developed for <i>Monochrysis</i> , Supra-littoral species
¹² ₂ *	U 36	Full strength (320/00) naturalistic sea water substitute. Otherwise as S 36	Requires light autoclaving to avoid precipitates at pH 8. Salinity too high for most purposes	High salinity	A diatom medium imitating natural sea water

Acknowledgments

This work was supported in part by contract NR 163-202 of the U.S. Office of Naval Research and by grant G-650 of the U.S. National Science Foundation to the Haskins Laboratories. Acknowledgment is made also to the U.S. Office of Naval Research and H. M. Development Commissioners for financial assistance to, and to the Scottish Marine Biological Association for leave of absence of, the third author (M. R. D.) for a visit to New York, which made possible the writing of this paper in collaboration.

We are greatly indebted to the following colleagues for their generous help: Dr. MARY PARKE of the Marine Laboratory of Plymouth for impure cultures of *Isochrysis galbana*; Professor TRYGVE BRAARUD of the Institute for Marine Biology of Oslo for impure cultures of *Syracospheara carterae*; Dr. B. SWEENEY of the Scripps Institute of Oceanography for bacteria-free cultures of *Eutreptia* sp. and raw cultures of *Gyrodinium californicum*; Dr. H. A. VON STOSCH of the Botanical Institute of Darmstadt for impure cultures of *Stephanopyxis turris*; Dr. R. LASKER of the Scripps Institute of Oceanography for impure cultures of *Rhodomonas lens*; Dr. R. A. LEWIN of the Marine Biological Laboratory of Woods Hole for bacteria-free cultures of *Pilinia*; Dr. J. H. RYTHER of the Oceanographic Institute, Woods Hole, for impure cultures of *Amphidinium Klebsii*; Drs. W. W. BOYD and H. CARPELAN of the University of California, Los Angeles, for water samples of Salton Sea; Dr. R. E. NORRIS of the University of Minnesota and Miss S. TENNEY for bacteria-free cultures of two species of *Gyrodinium*; Drs. M. SHILO and K. REICH of the Hebrew University of Jerusalem for one of the strains of *Prymnesium parvum*; Dr. H. S. VISHNIAC of Yale University for the S. 3 strain of a marine fungus; Miss J. M. KAIS of the Marine Biological Station, Port Erin, I.O.M., for the bacteria-free culture of *Prorocentrum micans*; Mr. S. MEYER of Miami University for trying our media on several marine fungi.

The isolation in bacteria-free culture of the organisms studied in New York was greatly facilitated by the use of antibiotic mixes which had been developed under grant G-3216 of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

Summary

The development of culture media for marine algae is traced from the time of MIQUEL (1890) to the present. The principles involved in designing synthetic media suitable for bacteria-free cultures of a variety of exacting organisms are discussed and an account given of their application in the United States and United Kingdom.

Enriched sea water of the ALLEN-MIQUEL and Erd-SCHREIBER (soil-extract) types have been extensively used. The former are suitable for unialgal (bacterized) cultures of diatoms and some flagellates, the latter for pure cultures of some species. The further addition of organic extracts and the use of sea water which has been allowed to age increases the range of organisms. The principal defects of these media are that they are prone to form precipitates upon sterilization and are difficult to reproduce exactly.

The literature shows that sea water substitutes based on analyses of sea water retain the defects of the latter and are unsuitable for most species even when enriched with essential trace elements. Small additions of extracts of natural substances improve them. There has thus been ample evidence of the need for organic as well as inorganic micro-nutrients.

The introduction of artificial chelating agents permitted sufficient heavy metal control for these sea water substitutes to be used for the identification in many cases of the essential organic micro-nutrients. For a number of species mixtures of the known B vitamins (particularly

thiamine and B_{12}) and chelated trace metals satisfactorily substituted for soil extract and natural sea water.

Refinement of the trace metal mixtures involved an overall attenuation of the earliest published formulae and a proper balancing of the metals against the chelator. The most generally successful solutions contain from 1—3 mg. % chelator (ethylenediamine tetraacetic acid) with a chelation ratio of from 3 : 1 to 1 : 1. Other chelators, such as trisodium hydroxyethylenediamine triacetate and nitrilotriacetic acid, are under trial and show some promise.

Deviations from natural sea water of the quantities of major ions have been found not only to be tolerated but beneficial, with the consequence that it has been possible to design sea water substitutes of greater flexibility, having low salinity and low calcium content. Such mixtures are less prone to precipitate during autoclaving. Greater flexibility is also obtained by lowering pH where possible which lessens the chances of precipitation and makes more available some organic compounds. Glycerophosphate is a useful non-precipitating phosphorus source.

The incorporation of pH buffering in the form of tris(hydroxymethyl)-aminomethane further improved synthetic media. It is now possible to hold pH relatively constant at any desired value between 7 and 9 both during autoclaving and for the duration of a culture even while 4% CO_2 is being administered.

Synthetic solutions suitable for the greatest variety of organisms, therefore, contain the following: (a) a low salinity sea water substitute with low calcium content, (b) chelated trace metals at low concentration with a chelation ratio lying between 3 : 1 and 1 : 1, (c) pH buffering, (d) in addition to macro-nutrients, mixtures of most commonly required growth factors and, occasionally, KREBS cycle intermediates, amino-acids and purines.

References

ALLEN, E. J.: On the culture of the plankton diatom *Thalassiosira gravida* Cleve, in artificial sea water. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **10**, 417—39 (1914). — ALLEN, E. J., and E. W. NELSON: On the artificial culture of marine plankton organisms. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **8**, 421—74 (1910).

BARKER, H. A.: The culture and physiology of the marine dinoflagellates. *Arch. Mikrobiol.* **6**, 157—81 (1935). — BLACK, W. A. P., and R. L. MITCHELL: Trace elements in the common brown algae and in sea water. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **30**, 575—84 (1952). — BOYD, W. W., H. CARPELAN and R. R. WHITNEY: Mimeographed Report on the University of California Salton Sea Research Program for the period Feb. 1, 1954 to May 20, 1954, Los Angeles 1954. — BRAARUD, T.: Salinity as an ecological factor in marine phytoplankton. *Plant. Physiol.* **4**, 28—34 (1951). — BRUCE, J. R., M. KNIGHT and M. PARKE: The rearing of oyster larvae on an algal diet. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **24**, 337—74 (1940). — BUTCHER, R. W.: Contributions to our knowledge of the smaller marine algae. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **31**, 175—92 (1952).

CHU, S. P.: Note on the technique of making bacteria-free cultures of marine diatoms. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **26**, 296—302 (1946a); The utilization of organic phosphorus by phytoplankton. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **26**, 285—95 (1946b). — COWPERTHWAITE, J., M. M. WEBER, L. PACKER and S. H. HUTNER: Nutrition of *Herpetomonas (Strigomonas) culicidarum*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **56** (5), 972—81 (1953).

DE VALERA, M.: Note on the difference in growth of *Enteromorpha* species in various culture media. *Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl.* **10**, 52—58 (1940). — DITTMAR, W.: On the alkalinity of ocean water. *Rept. Challenger Expdt.*, 1871—76, chem. **1**, 203 (1884). — DREW, G. H.: The reproduction and early development of *Laminaria digitata* and *Laminaria saccharina*. *Ann. of Bot.* **24**, 177—90 (1910). — DROOP, M. R.: On the ecology of flagellates from some brackish and fresh water rockpools of Finland. *Acta bot. fenn.* **51**, 1—52 (1953); A note on the isolation of small marine algae and flagellates for pure cultures. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **33**, 511—14 (1954a); Cobalamin requirement in Chrysophyceae. *Nature (Lond.)* **174**, 520 (1954b); Some new supra-littoral Protista. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **34**, 233—45 (1955a); A pelagic marine diatom requiring cobalamin. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **34**, 229—31 (1955b).

FØYN, B.: Lebenszyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophycee *Cladophora suhriana* Kützing. *Arch. Protistenk.* **83**, 1—56 (1934a); Lebenszyklus und Sexualität der Chlorophycee *Ulva lactuca* L. *Arch. Protistenk.* **83**, 154—77 (1934b).

GOLDBERG, E. D., T. J. WALKER and A. WHISENAND: Phosphate utilization by diatoms. *Biol. Bull. Woods Hole* **101**, 274—84 (1951). — GROSS, F.: Zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von *Noctiluca miliaris*. *Arch. Protistenk.* **83**, 178—96 (1934); Notes on the culture of some marine plankton organisms. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **21**, 753—68 (1937).

HÄMMERLING, J.: Über die Geschlechtsverhältnisse von *Acetabularia mediterranea* und *Acetabularia Wettsteinii*. *Arch. Protistenk.* **83**, 57—97 (1934). — HARVEY, H. W.: Substances controlling the growth of a diatom. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **23**, 499—519 (1939); Manganese and the growth of phytoplankton. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **26**, 562—79 (1947); Note on the absorption of organic phosphorus compounds by *Nitzschia closterium* in the dark. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **31**, 475—76 (1953); *The Chemistry and Fertility of Sea Waters*. Cambridge: University Press 1955. — HASHIMOTO, Y.: Vitamin B₁₂ in marine and freshwater algae. *J. Vitaminol. (Japan)* **1**, 49—54 (1954). — HAXO, F. T., and B. M. SWEENEY: Bioluminescence in *Gonyaulax polyedra*. In *The Luminescence of Biological Systems*, ed. F. H. Johnson, Washington, D. C.: Amer. Ass. Advancement of Sci. 1955. — HERBST, C.: Über die zur Entwicklung der Seigelarven notwendigen anorganischen Stoffe, ihre Rolle und ihre Vertretbarkeit: I: Die zur Entwicklung notwendigen anorganischen Stoffe. *Arch. Entwicklungsmech.* **5**, 649—93 (1897). — HUTNER, S. H.: Essentiality of constituents of sea water for growth of a marine diatom. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **10**, 136—41 (1948). — HUTNER, S. H., and L. PROVASOLI: The phytoflagellates. In *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, ed. A. Lwoff. New York: Academic Press Inc. 1951; A pigmented marine diatom requiring vitamin B₁₂ and uracil. *News Bull. Phycological Soc. Amer.* **6** (18), 7 (1953). — HUTNER, S. H., L. PROVASOLI, A. SCHATZ and C. P. HASKINS: Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Amer. phil. Soc.* **94**, 152—70 (1950). — HUTNER, S. H., L. PROVASOLI, E. L. R. STOKSTAD, C. E. HOFFMANN, M. BELT, A. L. FRANKLIN and T. H. JUKES: Assay of anti-pernicious anemia factor with *Euglena*. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* **70**, 118—20 (1949).

IMAI, T., and M. HATANAKA: Studies on marine non-colored flagellates, *Monas* sp., favorite food of larvae of various marine animals. I: Preliminary research on cultural requirements. Sci. Rep. Tohoku Univ. **18** (4), 304—15 (1950).

KETCHUM, B. H., and A. C. REDFIELD: A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. Biol. Bull., Woods Hole **75**, 165—9 (1938). — KILIAN, K.: Beiträge zur Kenntnis der Laminarien. Z. Bot. **3**, 433—94 (1911). — KYLIN, A.: The influence of trace elements on the growth of *Ulva lactuca*. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **13** (19), 185—92 (1943); The nitrogen sources and the influence of manganese on the nitrogen assimilation of *Ulva lactuca*. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **15** (4), 27—35 (1945). — KYLIN, H.: Biologische Analyse des Meerwassers. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **11** (21), 217—32 (1941); Über den Einfluß von Glucose, Ascorbinsäure und Heteroauxin auf die Keimlinge von *Ulva* und *Enteromorpha*. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **12** (12), 135—48 (1942); Über die Ernährung von *Ulva lactuca*. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **13** (21), 202—14 (1943); Über den Zuwachs der Keimlinge von *Ulva lactuca* in verschiedenen Nährflüssigkeiten. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **16** (23), 225—29 (1946).

LEVRING, T.: Some culture experiments with marine plankton diatoms. Göteborgs Vetensk. Samh. Handl., B, **3** (12), 1—18 (1945); Some culture experiments with *Ulva lactuca*. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **16** (7), 45—56 (1946). — LEWIN, J. C.: Silicon metabolism in diatoms. I: Evidence for the role of reduced sulfur compounds in silicon utilization. J. Gen. Physiol. **37**, 589—99 (1954). — LEWIN, R. A.: A marine *Stichococcus* sp. which requires vitamin B₁₂ (cobalamin). J. Gen. Microbiol. **10**, 93—96 (1954); Culture of *Prasiola stipitata* Suhr. Canad. J. Res. **33**, 5—10 (1955). — LOCHHEAD, A. G., and R. H. THEXTON: Vitamin B₁₂ as a growth factor for soil bacteria. Nature (Lond.) **167**, 1034—35 (1951). — LWOFF, A., et H. DUSI: Culture de divers flagellés leucophytes en milieu synthétique. C. r. Soc. Biol. (Paris) **127**, 53—55 (1938). — LYMAN, J., and R. H. FLEMING: Composition of sea water. J. Marine Res. **3**, 134—46 (1940).

MACLOED, R. A., and E. ONOFREY: Cation antagonism of the antibacterial antagonism of amines. J. of Biol. Chem. **210**, 193—201 (1954). — MATUDAIRA, T.: On inorganic sulphides as a growth-promoting ingredient for diatom. Proc. Imp. Acad. Japan **18**, 107—16 (1942). — McCLENDON, J. F., C. C. GAULT and S. MULHOLLAND: The hydrogen ion concentration, CO₂-tension and CO₂ content of sea water. Publ. Carneg. Inst., No. 251, Marine Biology **1917**, 21—69. — MELLOR, D. P., and L. MALEY: Order of stability of metal complexes. Nature (Lond.) **161**, 436—37 (1948). — MIQUEL, P.: De la culture artificielle des diatomées. Le Diatomiste **1** (9 & 10), 93—99 & 121—28 (1890—93).

NODDACK, I., u. W. NODDACK: Die Häufigkeiten der Schwermetalle in Meestieren. Arch. f. Zool. **32**, A (4), 1—35 (1939).

PARKE, M.: Studies on marine flagellates. J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd. **28**, 255—86 (1949); Studies on marine flagellates. II. Three new species of *Chrysocromulina*. J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd. **34**, 579—609 (1955). — PEACH, E. A., and J. C. DRUMMOND: On the culture of the marine diatom *Nitzschia closterium* (F). *minutissima*, in artificial sea water. Biochemic. J. **18**, 464—68 (1924). — PERRIER, E.: De l'emploi de l'eau de mer artificielle pour la conservation des animaux marins et en particulier des huîtres dans les grands Aquariums. C. r. Acad. Sci. (Paris) **110**, 1076—79 (1890). — PETERS, B.: The influence of some inorganic ions on the growth of *Enteromorpha intestinalis*. Acta Hort. gothoburg. **18**, 1—14 (1948). — PRINGSHEIM, E. G.: Die Kultur von Algen in Agar. Beitr. Biol. Pflanz. **11**, 305—333 (1912); Zur Physiologie der *Euglena gracilis*. Beitr. Biol. Pflanz. **12**, 1—47 (1913); Methoden und Erfahrungen. Beitr. Biol. Pflanz. **14**, 283—312 (1926).

Pure Cultures of Algae. Cambridge: University Press (1946a); The biphasic or soil-water culture method for growing algae and flagellata. J. Ecology **33**, 193 (1946b); On the nutrition of *Ochromonas*. Quart. J. Micr. Sci. **93**, 71—96 (1952). — PROVASOLI, L., and J. F. HOWELL: Culture of a marine *Gyrodinium* in a synthetic medium. Proc. Amer. Soc. Protozool. **3**, 6 (1952). — PROVASOLI, L., and I. J. PINTNER: Ecological implications of *in vitro* nutritional requirements of algal flagellates. Ann. New York Acad. Sci. **56** (5), 839—51 (1953); Cultural characteristics of *Phormidium persicum*, an auxotrophic marine red-pigmented blue-green alga. Rapp. Comm. 8th Cong. Internat. Bot. Paris., Sect. **17**, 39—40 (1954). — PROVASOLI, L., J. J. A. McLAUGHLIN and I. J. PINTNER: Relative and limiting concentrations of major mineral constituents for the growth of algal flagellates. Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser II, **16** (8), 412—17 (1954).

ROBBINS, W. J., A. HERVEY and M. E. STEBBINS: Further observations on Euglena and B_{12} . Bull. Torrey Bot. Club **78**, 363—75 (1951). — RODHE, W.: Environmental requirements of freshwater plankton algae. Symbolae bot. Upsalienses **10** (1), 1—149 (1948). — RYTHER, J.: The ecology of phytoplankton blooms in Moriches Bay and Great South Bay, Long Island, New York. Biol. Bull., Woods Hole **106** (2), 198—209 (1954).

SCHREIBER, E.: Die Reinkultur von marinem Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers. Wiss. Meeresuntersuch., N. F. **16** (10), 1—34 (1927). — STORM, J., and S. H. HUTNER: Nutrition of *Peranema*. Ann. New York Acad. Sci. **56** (5), 901—9 (1953). — SPENCER, C. P.: Studies on the culture of a marine diatom. J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd. **33**, 265—90 (1954). — SVERDRUP, H. H., M. W. JOHNSON and R. H. FLEMING: *The Oceans*. New York: Prentice-Hall 1942. — SWEENEY, B. M.: Culture of the dinoflagellate *Gymnodinium* with soil extract. Amer. J. Bot. **38**, 669—77 (1951); *Gymnodinium splendens*, a marine dinoflagellate requiring B_{12} . Amer. J. Bot. **41**, 821—4 (1954).

THOMPSON, T. G., and R. J. ROBINSON: Chemistry of the sea. Bull. Nat. Res. Coun., Wash., No. 85, **5**, 95—203 (1932).

VAN'T HOFF, J. H.: Zur Bildung der ozeanischen Salzablagerungen. Braunschweig 1905. — VISHNIAC, H. S.: Marine mycology. Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II, **17** (4), 352—60 (1955a); Nutritional requirements of isolates of *Labyrinthula* spp. J. Gen. Microbiol. **12**, 455—63 (1955b). — VISHNIAC, H. S., and S. W. WATSON: The steroid requirements of *Labyrinthula vitellina* var *pacifica*. J. Gen. Microbiol. **8**, 248—55 (1953).

WILSON, D. P.: A biological difference between natural sea waters. J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd. **30**, 1—20 (1951). — WILSON, W. B., and A. COLLIER: Preliminary notes on culturing *Gymnodinium brevis* Davis. Science (Lancaster, Pa.) **121**, No. 3142, 394—95 (1955).

A Carbon Dioxide Requirement for the Metabolism of Propionate in *Rhodospirillum rubrum*

By

R. K. CLAYTON*, E. O. ELLINGSON ** and H. E. SHAW***

With 5 figures in the text

(Eingegangen am 29. September 1956)

The metabolism of propionate in *Rhodospirillum rubrum* has assumed special importance as a result of studies in the phototaxis of this organism (CLAYTON 1953 and 1955b). The saturating light intensity for phototaxis, in the presence of propionate, is about four times as great as that for photosynthesis. The saturating light intensities for these two processes are roughly equal when such substrates as acetate, pyruvate, and succinate are present. An understanding of the mediation of tactic responses in *Rh. rubrum* thus involves an elucidation of the pathways by which propionate is metabolized.

It has often been reported (EISENBERG, 1953; C. B. VAN NIEL, verbal communication) that the oxidative metabolism of acetate and of propionate in *Rh. rubrum* will not begin in the absence of carbon dioxide. The role of CO₂ in synthetic processes, especially in the tricarboxylic acid cycle, has been studied recently by WIAME et al (1956). The present paper deals with the involvement of CO₂ in the oxidative metabolism of propionate, preliminary to more thorough studies using carbon-fourteen as a tracer.

Procedure

Rhodospirillum rubrum (strain S-1, VAN NIEL) was cultivated and adapted to the utilization of propionate as described in an earlier paper (CLAYTON, 1955a). The cells were then washed and suspended to a density of 2% (v/v) in 0.001 m phosphate buffer (pH 7.0). In each experiment, 1.0 ml of 0.5 m sodium propionate was added to 100 ml of the suspension of bacteria.

Measurement of the utilization of propionate was based on the fact that when one mole of propionic acid is withdrawn from a solution of sodium propionate, one mole of sodium hydroxide is left. The suspension was maintained at a pH of 7.0 by the gradual addition of 0.1 n H₂SO₄; micro-equivalents of acid added were equated to micro-moles of substrate dissimilated.

Experiments were conducted in a 250 ml beaker enclosed by a box to exclude light. Inserted into the beaker, through holes in the box, were pH-meter electrodes,

* U. S. Naval Postgraduate School, Monterey, California.

** Major, U. S. Air Force.

*** Captain, U. S. Army.

a burette for adding acid, and a gas dispersion tube for aerating the suspension. This simple apparatus was later modified to provide for variable illumination of the suspension, control of temperature, and recovery and analysis of the effluent air; these refinements were not needed in the experiments reported here.

A typical experiment began with the introduction of CO_2 -free air into the suspension without substrate. After the rate of endogenous alkali production had been established, sodium propionate was introduced. Subsequently, in some cases, carbon dioxide was added, either as sodium bicarbonate or by mixing it with the incoming air. The addition of sodium bicarbonate introduced an artefact in the titration curve: under aeration at pH 7.0 the bicarbonate was decomposed to CO_2 and NaOH; as the CO_2 was flushed out it was necessary to add acid equivalent to the NaOH liberated, in order to maintain a constant pH. In the figures discussed in the next section, a solid line represents the actual course of a titration; a dashed line describes the titration after correction for the foregoing artefact. The correction was based upon experiments in which bicarbonate was added to the suspension medium, in the absence of cells.

Results and Discussion

Fig. 1 illustrates one of four experiments which yielded similar results. Fig. 2 depicts one of two similar experiments. In these six experiments the degradation of propionate did not begin until carbon dioxide had

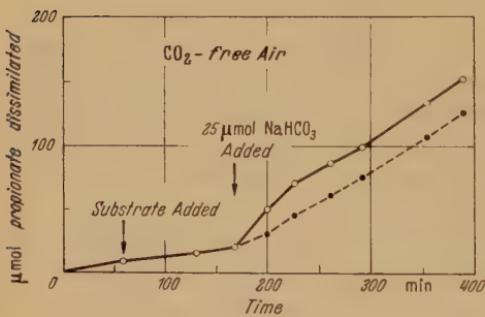


Fig. 1. Oxidative metabolism of propionate in *Rhodospirillum rubrum*. Ordinate actually represents microequivalents of H_2SO_4 added, maintaining a pH of 7.0; this was equated to micromols of propionate dissimilated. The dashed line represents values corrected for alkali introduced as NaHCO_3 .

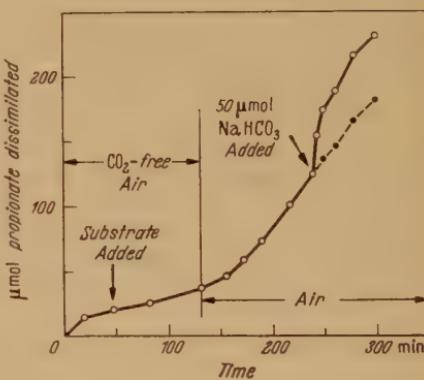


Fig. 2. Refer to fig. 1 for explanation

been added. Another experiment (fig. 3) demonstrated that CO_2 is needed only to initiate the metabolism; its subsequent withdrawal did not cause a decline in the rate at which propionate was dissimilated. Fig. 4 and 5 are typical of three experiments in which the utilization of propionate began before CO_2 had been added, either immediately upon adding the substrate or after a delay of about an hour.

We conclude that carbon dioxide is needed in trace amounts to initiate the oxidative metabolism of propionate in *Rhodospirillum rubrum*; once the process has begun its presence is no longer required. Where the meta-

bolism of propionate began spontaneously, sufficient amounts of carbon dioxide could have been present as a result of endogenous respiration.

Studies of propionate metabolism in various organisms have been reviewed by STADTMAN and STADTMAN (1953) and by CAMPBELL (1954); two distinct mechanisms have received support. The first is an oxidation to pyruvate, probably via acrylate and lactate; the second is a carboxylation to yield succinate. Our results

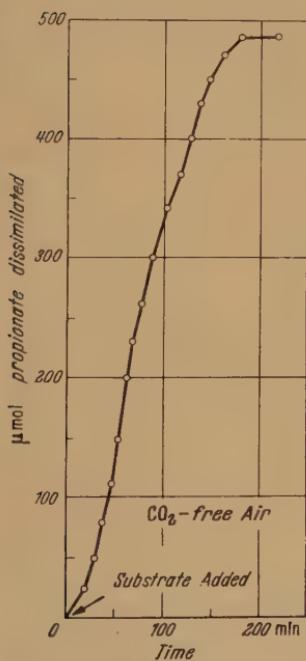


Fig. 4. Refer to fig. 1 for explanation

are difficult to interpret in terms of the first of these schemes, especially since carbon dioxide is not needed to initiate the respiration of lactate or of pyruvate in *Rh. rubrum*. The second scheme provides an obvious explanation of our observations. Carbon dioxide is needed only to initiate the metabolism,

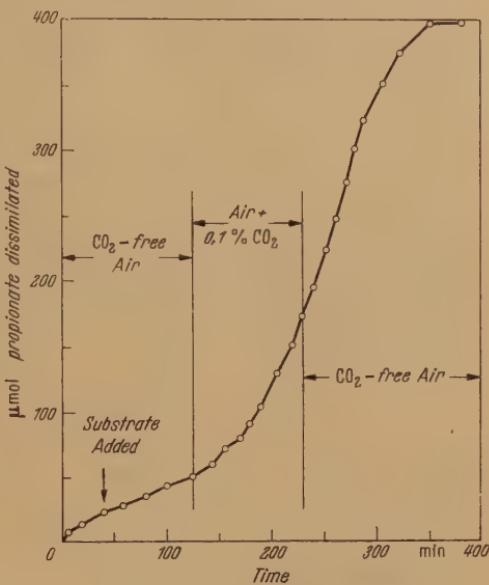


Fig. 3. Refer to fig. 1 for explanation

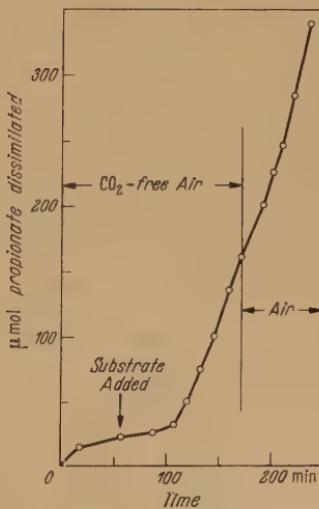


Fig. 5. Refer to fig. 1 for explanation

since the subsequent oxidation of succinate can yield additional CO₂. Succinate itself is dissimilated in the strict absence of external CO₂.

Summary

Trace amounts of carbon dioxide are needed to initiate the oxidative metabolism of propionate in *Rhodospirillum rubrum*. This result supports the view that the dissimilation of propionate begins with a carboxylation to yield succinate.

Acknowledgments: This work was supported by the Office of Naval Research.

References

CAMPBELL, J. J. R.: Annual. Rev. Microbiol. 8, 71 (1954). — CLAYTON, R. K.: Arch. Mikrobiol. 19, 125 (1953); 22, 180 (1955a); 22, 204 (1955b). — EISENBERG, M. A.: J. of Biol. Chem. 203, 815 (1953). — STADTMAN, E. R., and T. C. STADTMAN: Annual. Rev. Microbiol. 7, 143 (1953). — WIAME, J. M., C. ROZENBLUM and S. BOURGEOIS: Biochim. et Biophysica Acta 20, 43 (1956).

Berichtigungen

Zur Arbeit NORBERT PFENNIG, Archiv für Mikrobiologie 25, 109–136 (1956)

Seite 115, Zeile 8 von unten soll heißen 0,1 ml statt 1 ml.

Seite 135 im Literaturverzeichnis ist nachzutragen bei MIETTINEN, J. K.: Acta chem. scand. (Copenh.) 5, 962 (1951). —

Zur Arbeit W. SCHMIDT-LORENZ, Archiv für Mikrobiologie 25, 137–165 (1956)

Seite 138, Zeile 8 von oben: ist einzufügen: 0,05% MgSO₄ · 7 H₂O.

Seite 153, Zeile 12 von oben soll heißen O₂-Abwesenheit statt N₂-Abwesenheit.

Autoren - Verzeichnis

ABRAHAMSSON, A., s. NILSSON, G., und P. E. NILSSON. S. 1

BOCK, G., Über den Einfluß verschiedener Stoffe auf die Aktivität von Antibiotics gegenüber Mycobakterien. S. 246

BORTELS, H., Die Bedeutung einiger Spurenelemente für Cellvibrio- und Cytophaga-Arten. S. 226

BRUNNER, G., Eine neuere Beobachtung über Antibiose bei Pseudomonas-Bakterien. S. 369

CLAUS, D., Über Hemmstoffwirkung und Resistenzbildung bei Bakterien. S. 10

CLAYTON, R. K., E. O. ELLINGSON and H. E. SHAW, A Carbon dioxide requirement for the metabolism of propionate in *Rhodospirillum rubrum*. S. 429

CORB AZ, R., L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN und H. ZÄHNER, Zur Systematik der Actinomyceten. I. Über Streptomyces mit rhodomyccinartigen Pigmenten. S. 325

DEINEMA, M. H., and C. A. LANDHEER, Composition of fats, produced by *Lipomyces starkeyi*, under various conditions. S. 193

DREWS, G., und W. NIKLOWITZ, Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. III. Mitteilung. Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der Hormogonales. S. 333

DROOP, M. R., s. PROVASOLI, L., und J. J. A. McLAUGHLIN. S. 392

ELLINGSON, E. D., s. CLAYTON, R. K., and H. E. SHAW. S. 429

ETTLINGER, L., s. CORBAZ, R., und W. KELLER-SCHIERLEIN und H. ZÄHNER. S. 325

FRIEDRICH, H., Der Abbau von phenolischen Substanzen durch *Aspergillus niger*. S. 297

FROMMER, W., Erfahrungen mit Streptomyces-Dauerkulturen. S. 219

HELWIG, R., Untersuchungen an cellulosezersetzenden Pansenbakterien. S. 352

HUND, A., und O. KANDLER, Zur Ernährungsweise und Physiologie von *Caulobacter*. S. 65

JAGNOW, G., Untersuchungen über die Verbreitung von Streptomyceten in Naturböden. S. 274

KANDLER, O., s. HUND, A. S. 65

KELLER-SCHIERLEIN, W., s. CORBAZ, R., L. ETTLINGER und H. ZÄHNER. S. 325

LANDHEER, C. A., s. DEINEMA, M. H., S. 193

MARKOV, K. I., und G. K. SAEV, Veränderungen des elektrokinetischen Potentials bei der Adaptation der Staphylokokken an Penicillin. S. 201

MARTIN, H. H., und G. PAMPUS, Untersuchung über die Bildung des Actinomycins X. Über die Beeinflussung des Komponentenverhältnisses beim Actinomycin X durch Variation der mikrobiologischen Kulturbedingungen. S. 90

MCLAUGHLIN, J. J. A., s. PROVASOLI, L., und M. R. DROOP. S. 392

NIKLOWITZ, W., s. DREWS, G., S. 333

NILSSON, G., P. E. NILSSON and A. ABRAHAMSSON, Origin of spores of anaerobic micro-organisms in milk. The influence of feeding-practice and hygienic arrangements. S. 1

NILSSON, P. E., s. NILSSON, G., and A. ABRAHAMSSON, S. 1

NILSSON, R., s. TÓTH, L., and C. RYDIN. S. 208

PAMPUS, G., s. MARTIN, H. H., S. 90

PFENNIG, N., Veränderungen einfacher aminostickstoffhaltiger Substanzen in Mycel und Kulturmedium während des Wachstums von *Streptomyces spec.* S. 109

PROVASOLI, L., J. J. A. McLAUGHLIN und M. R. DROOP, The development of artificial media for marine algae. S. 392

RYDIN, C., s. TÓTH, L., and R. NILSSON. S. 208

SAEV, G. K., s. MARKOV, K. J., S. 201

SCHELHORN, M. v., Untersuchungen über das Absterben von Hefen und anderen Mikroorganismen im Substraten von hohem NaCl- bzw. Zuckergehalt. S. 39

SCHMIDT-LORENZ, W., Untersuchungen über den anaeroben Kohlenhydratstoffwechsel von *Aspergillus niger* van Tieghem. S. 137

SHAW, H. E., s. CLAYTON, R. K., and E. O. ELLINGSON. S. 429

TAKAMIYA, A., and K. TUBAKI, A new form of *Streptomyces* capable of growing autotrophically. S. 58

TÓTH, L., C. RYDIN, and R. NILSSON, Silage studies VI. Studies on fermentation processes in silage. Comparison of different types of forage crops. S. 208

TRÖGER, R., Studien über die fungicide Kupferwirkung bei *Fusarium decemcellulare*. S. 166

TUBAKI, K., s. TAKAMIYA, A. S. 58

UEBELMESSER, E.-R., Über einige neue Chytridineen aus Erdboden (*Olpodium*, *Rhizophidium*, *Phlyctochytrium* und *Rhizophlyctis*). S. 307

VÁVRA, J., Ist der Photoreceptor eine unabhängige Organelle der Eugleniden. S. 223

WITTMANN, H., Untersuchungen über die Veränderung der Carotinoidkomponenten von *Rhodotorula rubra* in Abhängigkeit von Ernährungsbedingungen. S. 373

ZÄHNER, H., s. CORBAZ, R., L. ETTLINGER und W. KELLER-SCHIERLEIN. S. 325

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenformen dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Flammenphotometrie

Von Dr. Roland Herrmann, Gießen. Mit 90 Textabbildungen. VIII, 327 Seiten Gr.-8°.
1956.

Ganzleinen DM 39,60

Flammenphotometrische Untersuchungsmethoden haben in den letzten Jahren in den verschiedensten Laboratorien von Wissenschaft und Industrie wegen ihrer großen Schnelligkeit und Zuverlässigkeit zunehmend an Verbreitung gewonnen. Von den einzelnen Fachrichtungen wurden viele Untersuchungsmethoden erarbeitet, die in Fachzeitschriften vieler Disziplinen verstreut sind. Das vorliegende Werk macht sich zur Aufgabe, die Grundlagen dieser Methode, die Fehlermöglichkeiten und die praktischen Anwendungsmöglichkeiten zusammenfassend darzustellen. Dabei wurden insbesondere die Dinge, die für den praktischen Analytiker von Bedeutung sind, wie Apparatekunde, Meßtechnik, die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden, die Grenzen der einzelnen Methoden u. ä., in den Vordergrund gestellt. Das Werk ist mit ausführlich gehaltenen Tabellen über die Flammenlinien und Banden, über die unteren Nachweisbarkeitsgrenzen, über die gegenseitige Beeinflussung der Elemente in der Flamme u. ä. versehen. Ein Literaturverzeichnis mit 652 Titeln und ein ausführlich gehaltenes Sachverzeichnis mit mehr als 1100 Stichworten werden das Werk jedem fortschrittlichen Analytiker unentbehrlich machen.

Physiologische Chemie

Ein Lehr- und Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker

Hervorgegangen aus dem Lehrbuch der Physiologischen Chemie von **Olof Hammarsten**. In zwei Bänden.

Zweiter Band: Der Stoffwechsel

Herausgegeben von Professor Dr. B. Flaschenträger, Alexandria, und Professor Dr. E. Lehnartz, Münster i. Westf.

II. Teil, Bandteil a.

Mit 70 Textabbildungen. IX, 1396 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 186,—

D. Physiologische Chemie einzelner Lebensvorgänge und Organe (Fortsetzung).

IV. Biochemie einiger Organe. Leber und Galle. Von Z. Stary, Istanbul. Allgemeines. Die Leber im Stoffwechsel anorganischer Stoffe. Die Leber im Kohlenhydratstoffwechsel; im Fettstoffwechsel; im Stoffwechsel der Aminosäuren und der Proteine. Die Nucleinsäuren der Leber und ihre Bausteine. Die Leber im Vitaminstoffwechsel. Die Leber und das endokrine System. Die Entgiftungsfunktion der Leber. Die hepatotropen Cancergene und ihre Wirkung auf den Leberstoffwechsel. Die Leber im Stoffwechsel der Porphyrinsubstanzen und die Ausscheidung der Gallenfarbstoffe. Die Galle. — Muskel. Von K. Lohmann, Berlin, und P. Ohlmeyer, Tübingen. Skeletmuskel. Herzmuskel. Glatte Muskeln. — Gehirn und Nerven. Von C. G. Schmidt, Bad Nauheim. Der chemische Aufbau des Zentralnervensystems und der peripheren Nerven. Stoffwechsel und Fermente. Stoffwechsel und Funktion des Zentralnervensystems. Chemische Vorgänge bei Erregung und Erregungsleitung. Schlußbemerkung. — Auge und Tränen. Von H. Süllmann, Münster i. Westf. Allgemeines. Die Tränenflüssigkeit. Die Bindehaut (Conjunctiva). Die Lederhaut (Sklera). Die Hornhaut (Cornea). Die Linse (Lens crystallina). Das Kammerwasser (Humor aquaeus). Der Glaskörper (Corpus vitreum). Die Gefäßhaut (Uvea). Die Netzhaut (Retina). Der Sehnerv (N. opticus). — Namen- und Sachverzeichnis.

Bandteil b und c in Vorbereitung.

Erster Band: Die Stoffe

Herausgegeben von Professor Dr. B. Flaschenträger, Alexandria, unter Mitwirkung von Professor Dr. E. Lehnartz, Münster i. Westf.

Mit 93 Textabbildungen. VIII, 1600 Seiten Gr.-8°. 1951. Ganzleinen DM 198,—

Zweiter Band: Der Stoffwechsel

Herausgegeben von Professor Dr. B. Flaschenträger, Alexandria, und Professor Dr. E. Lehnartz, Münster i. Westf.

I. Teil, Bandteil a und b.

Mit 62 Textabbildungen. VI, VI, 1717 Seiten Gr.-8°. 1954. In zwei Teilen gebunden.

Ganzleinen DM 198,—

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG